

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

***Citomegalovirus* congénito: análisis de los genotipos virales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Jesús Barrado Blanco

Directora

M^a Dolores Folgueira López

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I



**CITOMEGALOVIRUS CONGÉNITO: ANÁLISIS DE LOS
GENOTIPOS VIRALES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Jesús Barrado Blanco

Bajo la dirección de la doctora

M^a Dolores Folgueira López

2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I



***CITOMEGALOVIRUS CONGÉNITO: ANÁLISIS DE LOS
GENOTIPOS VIRALES***

Tesis Doctoral

Laura Jesús Barrado Blanco

Madrid, 2015

*A mis padres,
A Gustavo,
A mi familia*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido en la realización de este trabajo de una manera u otra:

Mi agradecimiento a la Dra. Lola Folgueira, bajo cuya dirección se ha llevado a cabo esta tesis, gracias por guiarme y supervisar este proyecto, por permitirme quitarle horas de su tiempo de ocio, por enseñarme el interesante mundo de la virología, por el apoyo brindado en el desarrollo de mi futuro profesional, por creer en mí, por su ánimo, por su calidad humana y paciencia.

A Columbiana Prieto y Carmen Vera, por haberme enseñado los métodos y técnicas imprescindibles para la realización de este trabajo. Pero sobre todo, por sacarme una sonrisa todos los días, por su paciencia infinita, por ser un ejemplo de buenas personas y profesionales.

A todo el personal del Servicio de Microbiología del Hospital 12 de Octubre, en especial al Dr. Rafael Delgado, Dr. J.J Rodríguez Otero, Dra. Francisca Sanz, Dra. M^a Ángeles Orellana, Dra. Elia Palenque, Dr. Antonio Fuertes, Dr. Efrén Salto, Dra. Amalia del Palacio, y Dr. Alfredo Pérez Rivilla, el haber posibilitado mi trabajo en él, y a los técnicos del laboratorio (Esther, Ana, Charete, Mar, Antonia, Rosa, Rosaura, Paquita, Yolanda, Alicia) por enseñarme los procedimientos básicos en el laboratorio de microbiología durante estos años. Cada uno de ellos ha aportado un granito de arena en mi formación.

Al Dr. Fernando Chaves, ejemplo de constancia, entusiasmo, trabajo, y calidad humana. Por haberme dado la oportunidad cuando terminé la

residencia de formar parte de su equipo de investigación, por creer en mí, por siempre estar disponible a responderme a esas preguntas del mundo microbiano que le hago desde lejos.

A las residentes del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre en especial a Almudena, Joshi, Esther, Jennifer, Carmen, Lula, Adela, Patricia, Sara, Olalla y Joanna por haber sido buenas compañeras en mi período de formación como especialista y en el período como investigadora, por los buenos y malos momentos dentro y fuera del laboratorio, por nuestros viajes.

A todo el personal del Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario de Navarra, en especial a Carmen Ezpeleta, Xabier Beristain, Ana Mazón, y Carmen Martín. Gracias por haber confiado en mí dándome mi primer trabajo como adjunta. Gracias por ser compañeros, por ser un equipo de grandes profesionales y personas, por estar siempre dispuestos a ayudarme, hacerme partícipe de sus proyectos y enseñanzas, y darme otra visión diferente de la microbiología.

A todo el personal del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital García Orcoyen de Estella, en especial a Eva Ongay, Elena Martín, Roque Díaz, Sara Leza, Ana Lacoma, Miriam Fácila, Oihane Gorriti y Carolina Gómara. Por nuestras risas, por ser ejemplo de profesionalidad, por ser buenas personas, por hacerme el día a día más fácil. Gracias por acogerme con los brazos abiertos, hacerme sentir como si estuviera dentro de una gran familia, por animarme cuando pienso en la lejanía de mi familia, pareja y amigos.

A mis padres, a Gustavo y a mi familia “gallega”, por el apoyo incondicional que siempre me brindan, por compartir conmigo el entusiasmo

por cada proyecto, escucharme y animarme cada vez que lo necesitaba, por permitirme robarles parte del tiempo que les habría dedicado, sobre todo en estos momentos tan difíciles para nosotros. A pesar de la distancia, siento que siempre los tengo cerca. Sin ellos, no sería lo que soy, y no hubiera sido capaz de llevar esto a término.

Esta tesis ha sido financiada en parte por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (Proyecto FIS 13/02347)

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

Listado de Tablas

Listado de Figuras

Summary

Resumen

	Página
1. Introducción	3
1.1. Generalidades	3
1.2. Descripción del virus	4
1.2.1. Nucleocápside	5
1.2.2. Tegumento	5
1.2.3. Envoltura lipídica	7
1.3. Genoma y variabilidad	8
1.3.1. Estructura del genoma	8
1.3.2. Variabilidad genética	11
1.3.2.1. Glicoproteína B (gB)	13
1.3.2.2. Glicoproteína H (gH)	17
1.3.2.3. UL144	21
1.3.2.4. Otros	22
1.4. Mecanismo de replicación y patogénesis	24
1.4.1. Ciclo de replicación	24
1.4.2. Latencia	26
1.4.3. Respuesta inmune	27
1.5. Epidemiología	28
1.5.1. Infección congénita	29
1.5.2. Infección perinatal	32

	Página
1.5.3. Transmisión por contacto directo	33
1.5.4. Transmisión por trasplante de órganos	34
1.5.5. Transmisión por transfusiones sanguíneas	34
1.5.6. Transmisión por vía sexual	35
1.6. Manifestaciones clínicas	35
1.6.1. Infección congénita	37
1.6.2. Infección en el receptor de trasplante	40
1.7. Métodos diagnósticos de laboratorio	
1.7.1. Histopatología	42
1.7.2. Diagnóstico serológico	43
1.7.2.1. Serología de la embarazada	44
1.7.2.2. Serología en el recién nacido	49
1.7.2.3. Serología de la infección postnatal	49
1.7.2.4. Serología en los receptores de TOS	49
1.7.3 Cultivo celular	50
1.7.4 Prueba de antigenemia	52
1.7.5 Métodos de amplificación genómica	54
1.7.5.1. Diagnóstico prenatal de la infección congénita	55
1.7.5.2. Diagnóstico postnatal de la infección congénita	58
1.7.5.3. Diagnóstico de la infección postnatal o adquirida	61
1.7.5.4. Diagnóstico en el receptor de TOS	62
1.8. Tratamiento y Prevención	64
1.8.1. Tratamiento	64
1.8.1.1. Tratamiento prenatal	64
1.8.1.2. Tratamiento postnatal	66
1.8.1.3. Tratamiento de la infección adquirida	67
1.8.1.4. Tratamiento del receptor de TOS	67
1.8.2. Prevención	68
1.8.2.1. Profilaxis en el receptor de TOS	68

	Página
1.8.2.2. Prevención de la infección congénita	69
2. Justificación, hipótesis y objetivos	71
2.1. Justificación	73
2.2. Hipótesis	74
2.3. Objetivos	74
3. Material y Métodos	75
3.1. Tipo y ámbito de estudio	77
3.2. Criterios de inclusión y período de estudio	77
3.3. Definiciones	77
3.4. Protocolo de recogida de datos	78
3.5. Obtención y procesamiento de las muestras	79
3.6. Cultivo celular convencional	81
3.6.1. Medios de cultivo y reactivos	81
3.6.2. Materiales e instrumentos	81
3.6.3. Procedimiento	82
3.6.3.1. Preparación de las células	82
3.6.3.2. Inoculación de los cultivos celulares	83
3.7. Cultivo shell-vial (centrifugación)	83
3.7.1. Medios de cultivo y reactivos	83
3.7.2. Materiales e instrumentos	84
3.7.3. Procedimiento	84
3.8. Prueba de antigenemia	86
3.8.1. Reactivos, materiales e instrumentos	86
3.8.2. Procedimiento	87

	Página
3.9. PCR en tiempo real	90
3.9.1. Medidas de seguridad	90
3.9.2. Extracción de ácidos nucleicos	92
3.9.3. PCR en tiempo real	93
3.9.3.1 Reactivos	93
3.9.3.2 Material e instrumentos	93
3.9.3.3. PCR cualitativa (Sangre fetal, líquido amniótico, sangre de tarjetas de pruebas metabólicas)	94
3.9.3.3.1. Mezcla de reacción	94
3.9.3.3.2. Condiciones de amplificación	95
3.9.3.4. PCR cuantitativa (Sangre fetal, líquido amniótico, sangre completa)	95
3.9.3.4.1. Mezcla de reacción	95
3.9.3.4.2. Condiciones de amplificación	96
3.9.3.5 Genotipado de Citomegalovirus	96
3.9.3.5.1. Genotipado de Glicoproteína B y H	96
3.9.3.5.2. Genotipado de UL144	98
3.10. Secuenciación UL144	99
3.10.1. Purificación	100
3.10.2. Reacción de secuenciación	100
3.10.3. Precipitación	101
3.10.4. Análisis de secuencias e interpretación de resultados	102
3.11. Análisis estadístico	102
4. Resultados	105
4.1. Muestras clínicas analizadas por tipo de paciente	107
4.2. Datos clínicos	109

	Página
4.2.1. Niños con infección congénita	109
4.2.2. Diagnóstico prenatal	117
4.2.3. Niños con infección adquirida	123
4.2.4. Pacientes trasplantados	124
4.3 Distribución de los genotipos y su relación con las diferentes variables clínicas estudiadas	125
4.3.1. Glicoproteína B	125
4.3.1.1. Glicoproteína B en infección congénita	125
4.3.1.2. Glicoproteína B en infección adquirida	135
4.3.1.3. Glicoproteína B en pacientes trasplantados	138
4.3.2. Glicoproteína H	142
4.3.2.1. Glicoproteína H en infección congénita	142
4.3.2.2. Glicoproteína H en infección adquirida	151
4.3.2.3. Glicoproteína H en pacientes trasplantados	154
4.3.3. UL144	158
4.3.3.1. UL144 en infección congénita	158
4.3.3.2. UL144 en infección adquirida	170
4.3.3.3. UL144 en pacientes trasplantados	173
5. Discusión	179
5.1. Frecuencia de presentación de los diferentes genotipos de glicoproteína B, glicoproteína H y UL144 en pacientes con infección congénita por CMVh	182
5.2. Comparación de la distribución de estos genotipos en un grupo control de pacientes pediátricos en los que se ha documentado primoinfección por CMVh y en receptores de TOS	190
5.3. Relación entre los genotipos encontrados en los pacientes con infección congénita y la severidad de las manifestaciones clínicas	199
5.4. Asociación entre alguno de los genotipos y la presentación de cargas virales elevadas	212
5.5. Limitaciones del estudio	216

	Página
6. Conclusiones	219
7. Bibliografía	223
8. Anexos	255
Anexo I. Ficha de recogida de datos de infección congénita	257
Anexo II. Publicaciones relacionadas con la tesis	259
Anexo III. Breve <i>Curriculum vitae</i>	261

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Listado de proteínas del tegumento de CMVh.

Tabla 2. Glicoproteínas identificadas en CMVh.

Tabla 3. Variabilidad en los genes de CMVh.

Tabla 4. Prevalencia de infección por CMVh en mujeres con edad reproductiva.

Tabla 5. Tasa de incidencia de enfermedad por CMVh en trasplante de órgano sólido.

Tabla 6. Manifestaciones clínicas e impacto clínico de la infección tras el trasplante de órgano sólido.

Tabla 7. Primers y sondas utilizadas en las PCR realizadas en el estudio.

Tabla 8. Parámetros analíticos estudiados en los niños con infección congénita.

Tabla 9. Hallazgos en la ecografía y/o resonancia magnética cerebral de 20 pacientes con infección sintomática por CMVh.

Tabla 10. Resumen del conjunto de hallazgos obtenidos en los diferentes estudios de neuroimagen realizados en 20 niños con infección congénita sintomática.

Tabla 11. Alteraciones en el neurodesarrollo en niños con infección congénita por CMVh.

Tabla 12. Características clínicas de los pacientes con infección congénita diagnosticada mediante tarjetas de pruebas metabólicas.

Tabla 13. Características principales de las diecisiete gestantes con diagnóstico prenatal de infección congénita.

Tabla 14. Parámetros analíticos estudiados en las sangres fetales.

Tabla 15. Motivos más frecuentes de remisión de las muestras de infección adquirida al laboratorio de virología.

Tabla 16. Parámetros analíticos y su relación con el genotipo de glicoproteína B en los niños con infección congénita.

Tabla 17. Relación entre el genotipo de glicoproteína B y las características clínicas estudiadas en niños con infección congénita.

Tabla 18. Relación entre el genotipo de glicoproteína B y las características clínicas en el diagnóstico prenatal de infección congénita.

Tabla 19. Pacientes trasplantados con más de una muestra en las que se encontraron diferentes genotipos de glicoproteína B.

Tabla 20. Relación entre el genotipo de glicoproteína B y las diferentes características clínicas estudiadas en receptores de trasplante.

Tabla 21. Parámetros analíticos y su relación con el genotipo de glicoproteína H en los niños con infección congénita.

Tabla 22. Relación entre el genotipo de glicoproteína H y las características clínicas estudiadas en niños con infección congénita.

Tabla 23. Relación entre el genotipo de glicoproteína H y las características clínicas en el diagnóstico prenatal de infección congénita.

Tabla 24. Pacientes trasplantados con más de una muestra en las que se encontraron diferentes genotipos de glicoproteína H.

Tabla 25. Relación entre el genotipo de glicoproteína H y las diferentes características clínicas estudiadas en receptores de trasplante.

Tabla 26. Parámetros analíticos y su relación con el genotipo de glicoproteína UL144 en los niños con infección congénita.

Tabla 27. Relación entre el genotipo de UL144 y las características clínicas estudiadas en niños con infección congénita.

Tabla 28. Relación entre el genotipo de UL144 y las características clínicas estudiadas en el diagnóstico prenatal de infección congénita.

Tabla 29. Pacientes trasplantados con más de una muestra en las que se encontraron diferentes genotipos de UL144.

Tabla 30. Relación entre el genotipo de UL144 y las diferentes características clínicas estudiadas en receptores de trasplante.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración de células citomegálicas infectadas con inclusiones intranucleares.

Figura 2. Estructura del virión de CMVh.

Figura 3. Esquema del genoma de CMVh de una cepa salvaje y de una cepa de AD169.

Figura 4. Contenido genético de la cepa salvaje de CMVh.

Figura 5. Esquema de la glicoproteína gB de CMVh.

Figura 6. Glicoproteína B en forma de roseta: residuos hidrofóbicos (amarillo), residuos cargados positivamente (azul), residuos cargados negativamente (rojo).

Figura 7. Receptores de la entrada viral de CMVh atendiendo a los diferentes tipos de células.

Figura 8. Ilustración del ciclo de replicación de CMVh.

Figura 9. Variaciones de los niveles de anticuerpos IgM, IgG e IgG avidéz.

Figura 10. Algoritmo propuesto de cribado universal de CMVh.

Figura 11. Algoritmo propuesto del manejo de mujeres con IgG CMV positiva e IgM CMV positiva.

Figura 12. Medios de transporte para el envío de los diferentes tipos de muestra.

Figura 13. Observación mediante microscopio de fluorescencia de un cultivo shell-vial de células MRC-5 infectadas con CMVh.

Figura 14. Observación mediante microscopio invertido de una prueba de antigenemia pp65.

Figura 15. Laboratorio de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Figura 16. Sistema automático de extracción NucliSENS® easyMag.

Figura 17. Imagen del secuenciador ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer.

Figura 18. Distribución estacional de las muestras de infección congénita remitidas al laboratorio de virología durante los años 2002-2013.

Figura 19. Distribución estacional de las muestras de infección adquirida remitidas al laboratorio de virología durante los años 2002-2013.

Figura 20. Secuelas en el neurodesarrollo de los 33 pacientes con infección congénita.

Figura 21. Distribución de los genotipos de glicoproteína B en muestras de infección congénita.

Figura 22. Distribución de los genotipos de glicoproteína B en función del año de diagnóstico de infección congénita.

Figura 23. Parámetros analíticos atendiendo a los diferentes genotipos de glicoproteína B en los niños con infección congénita.

Figura 24. Distribución de los genotipos de glicoproteína B en niños con infección adquirida.

Figura 25. Distribución de los genotipos de glicoproteína B de infección adquirida en función del periodo estudiado.

Figura 26. Distribución de los genotipos de glicoproteína B en niños con infección congénita y adquirida.

Figura 27. Distribución de los genotipos de glicoproteína B en función del periodo estudiado de infección congénita e infección adquirida.

Figura 28. Medianas de la antigenemia, carga viral en plasma y carga viral en células atendiendo al genotipo de glicoproteína B.

Figura 29. Distribución de los genotipos de glicoproteína H en muestras de infección congénita.

Figura 30. Distribución de los genotipos de glicoproteína H en función del año de diagnóstico de infección congénita.

Figura 31. Parámetros analíticos atendiendo a los diferentes genotipos de glicoproteína H en los niños con infección congénita.

Figura 32. Distribución de los genotipos de glicoproteína H en niños con infección adquirida

Figura 33. Distribución de los genotipos de glicoproteína H de infección adquirida en función del periodo estudiado

Figura 34. Distribución de los genotipos de glicoproteína H en niños con infección congénita y adquirida.

Figura 35. Distribución de los genotipos de glicoproteína H en función del periodo estudiado de infección congénita e infección adquirida.

Figura 36. Medianas de la antigenemia, carga viral en plasma y carga viral en células atendiendo al genotipo de glicoproteína H.

Figura 37. Imagen de electroforesis en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio en el que se puede apreciar el fragmento amplificado de 737 pb de UL144.

Figura 38. Distribución de los genotipos de UL144 en muestras de infección congénita.

Figura 39. Distribución de los genotipos UL144 en función del año de diagnóstico de infección congénita.

Figura 40. Parámetros analíticos atendiendo a los diferentes genotipos de UL144 en los niños con infección congénita.

Figura 41. Distribución de los genotipos UL144 en las muestras de pacientes con infección adquirida.

Figura 42. Distribución de los genotipos de UL144 en función del periodo estudiado en pacientes con infección adquirida.

Figura 43. Distribución de los genotipos de UL144 en niños con infección congénita y adquirida.

Figura 44. Distribución de los genotipos UL144 en función del año de diagnóstico de infección congénita y adquirida.

Figura 45. Medianas de la antigenemia, carga viral en plasma y carga viral en células atendiendo al genotipo de UL144.

TITLE: Congenital Cytomegalovirus: analysis of viral genotypes

INTRODUCTION: Human cytomegalovirus (hCMV) infects many cell types resulting in a diverse range of clinical manifestations suggesting that the clinical course may be related to genetic variation between strains and host immune response. The diagnostic techniques used today do not allow us to identify that infected patients will develop sequelae; however, to date the evidence available suggests that both factors of the host and viral factors as maternal immunity, viral load in the amniotic fluid or the type strain hCMV, can contribute to the development of congenital infection, being recently viral load proposed as a good predictive and prognostic marker of the severity of the disease especially hearing loss and systemic manifestations, but still unknown genes that influence viral load. Approximately twenty Open Read Fragments exhibit nucleotide variability demonstrated in several studies established the existence of different genotypes or groups. If this variability contributes to the evolution of hCMV infection in general and congenital infection in particular, it is currently being debated.

HYPOTHESIS: The study of the different genotypes of genes encoding the envelope proteins such as gB, gH, and homologous receptor UL144 tumor necrosis factor, and its correlation with clinical severity and course of the infection, they will help us to establish what virulence markers should be monitored for prognostic purposes, and the appropriateness of the duration of antiviral treatment when indicated.

OBJECTIVES: The objectives of this study were: 1) To analyze the frequency of occurrence of different genotypes envelope proteins (UL55, gB, UL75, gH) and UL144 in pregnant patients with congenital infection by hCMV; 2) To compare the distribution of these genotypes in a control group of pediatric patients aged 2 months that documented primary infection by hCMV and solid organ transplantation recipients; 3) To relate genotypes found in patients with congenital infection with the severity of clinical manifestations, and finally 4) To study the association between any of the genotypes and presentation of high viral loads.

METHODS: An observational retrospective case-control study was conducted at Hospital Universitario 12 de Octubre in Madrid (Spain). During 2002-2013 fifty-six samples from prenatal or postnatal diagnosis of congenital hCMV infection were included. The control group was composed of samples from 40 pediatric patients over 2 months old with suspected primary infection hCMV. Furthermore, 162 peripheral blood samples from 62 solid organ transplantation recipients were studied. Demographic, clinical, laboratory, radiological and microbiological data were collected. Depending on the type of sample, conventional cell culture and / or shell-vial and / or detection of nucleic acids of the different types of sample were carried out. After decontamination, were inoculated on MRC-5 cell lines (Vircell, S.L., Genoma, Spain), incubated at 37°C and evaluated for cytopathic effect development for seven days. The viruses were classified by immunofluorescence assay (IFA) with monoclonal antibodies to Cytomegalovirus immediate-early antigens (Innogenetics). A total of 500µl of each sample was extracted using Nuclisense EasyMag® instrument (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) according to the manufacturer's instructions.

The set of primers and probes used to detect CMV were previously described. The amplification was conducted in a LightCycler® 2.0 real-time PCR system or LightCycler® 480 II Instrument (Roche Diagnostic, Spain). For genotyping of gB and gH, there were used specific probes and primers, while UL144 gene was first genotyped by real-timePCR, the genotypes were grouped according to the different melting temperatures, and several representatives from each group were sequenced. The sequencing was performed using ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). The sequences obtained were analyzed and assembled by Geneious program (Invitrogen, USA). Data were analyzed with SPSS version 17.0 (SPSS, Chicago, USA), Epi Info™ version 3.5.4 (CDC, Atlanta, USA) and Epidat 3.0 (Pan American Health Organization).

RESULTS: Fifty-six patients with suspected congenital infection, 39 children and 17 pregnant were included. The median [interquartile range (IQR)] age at which conducted the diagnosis of congenital infection in children was 9 [3-39.5] days. Twenty-seven children were symptomatic. The ultrasonographic findings obtained by ultrasound and / or MRI brain scan showed 20 (51.3%) and 10 (25.6%) patients with impaired and normal on imaging tests, respectively. Twenty-five (64.1%) patients reported some kind of neurodevelopmental sequel, being the most common hearing impairment followed by psychomotor retardation, visual deficit and microcephaly. Among the 17 pregnant with prenatal diagnosis of congenital infection, 11 (64.7%) patients showed findings extra cerebral as hepatomegaly (52.9%), cardiomegaly (47.05%), ascites (23.5%), placentomegaly (23.5%) and splenomegaly (17.6%). Brain findings were present in 12 patients (70.6%), where the punctate hyperechoic parenchymal (29.4%) and ventriculomegaly (23.5%) were the most frequent.

The most prevalent genotype of glycoprotein B was gB3 congenital infection (34.5%), followed by gB1 (27.3%), gB2 (25.4%), and gB4 (9.1%), and 3.6% of mixed infection was detected. No statistically significant differences between laboratory parameters, clinical, viral loads and glycoprotein B genotype were found, except the gB3 genotype, where the motor involvement was less frequent ($p = 0.02$) and gB2 genotype in which was more frequent the presence of periventricular cysts ($p=0.05$). When congenital infection and acquired infection were compared, it was observed that gB3 was more common in congenital infection ($p = 0.01$), and gB1 in acquired infection ($p = 0.01$), which the percentage of mixed genotypes was 10%. In transplantation, the majority genotype was gB1 (38.9%) and 6.8% of infections were detected by multiple genotypes. The genotype gB1 was associated with anti-CMV antibodies IgG positive at the time of transplantation ($p = 0.004$), viral syndrome ($p = 0.01$), and stand hCMV infection most advance after transplantation ($p = 0.02$) than the other genotypes. The gB2 genotype was associated with viral syndrome ($p = 0.03$) and higher viral load in cells than other genotypes ($p = 0.02$). The genotype gB3 was associated with anti-CMV antibodies IgG positive at the time of transplantation ($p = 0.01$), asymptomatic viremia ($p < 0.001$), and present less value antigenemia ($p = 0.001$), viral load in cells ($p < 0.001$) and in plasma ($p = 0.04$) than the other genotypes. The gB4 genotype was only associated with lower viral load than other genotypes ($p = 0.01$).

The most prevalent genotype of glycoprotein H in congenital infection was gH1 (55.35%) followed by gH2 (41.07%). Infection with multiple genotypes (gH1-gH2) was detected in an infant (1.8%). No statistically significant differences between the analytical parameters, the variables studied, viral loads

and different genotypes were found, except the genotype gH2, which it was more frequent in patients with ocular involvement ($p = 0.01$), and gH1 occurred in older pregnant women. The glycoprotein H genotype in acquired infection more prevalent was gH1 (55%) followed by gH2 (37.5%), and 5% of mixed genotypes were detected. No genotype prevailed over the other (gH1 $p = 0.99$ and gH2 $p = 0.74$) when populations of congenital and acquired infection were compared, however multiple genotype infections were more frequent in acquired infection ($p = 0.37$). In transplantation, the distribution of genotypes was gH1 glycoprotein H (35.8%) and gH2 (29.62%) and 31.48% mixed genotypes were detected. The gH1 genotype was associated with anti-CMV antibodies IgG positive at the time of transplantation ($p = 0.007$), asymptomatic viremia ($p = 0.01$) and hCMV infection occur later than other genotypes ($p < 0.001$). The gH2 genotype was not associated with receptor-positive ($p = 0.004$), a viral syndrome ($p = 0.004$) and at increased viral load than other genotypes ($p = 0.01$). The mixed genotype was associated with anti-CMV antibodies IgG positive at the time of transplantation ($p = 0.001$), and hCMV infection occurs earlier after transplantation with other genotypes ($p < 0.001$).

The UL144 genotype more prevalent in congenital infection was UL144 B (41.50%) followed by UL144 C (22.64%), UL144 A (20.75%), and UL144 A/C (15.09%). There were no statistically significant differences between the analytical parameters, the variables studied, viral loads and different genotypes, except to UL144 A/C genotype, which was more common presenting unilateral hearing loss with respect to other genotypes ($p = 0.03$). In addition, UL144 C genotype was more frequent in younger pregnant women, and appeared more frequently in primiparous, while genotype UL144 B in older women, and more

often presented splenomegaly as extracerebral finding. The genotype of glycoprotein UL144 more prevalent in acquired infection was UL144 B (31.57%) followed by UL144 A (22.4%), UL144 A/C (30%), UL144 C (12.5%), and UL144 A/B (2.5%). No genotype prevailed over the other when comparing children with congenital and acquired infection. In transplantation, the distribution of genotypes was UL144 A (3.7%), UL144 B (79.6%), UL144 C (4.3%), and UL144 A/C (3.08%). There were no relationships with the different clinical characteristics, except for UL144C genotype, which was found less frequently in patients with asymptomatic viremia ($p = 0.04$).

DISCUSSION: The genotype gB3 was present in more than a third of the study population (34.5%), which together with genotype 1 contributed about 60% of the cases studied. This frequency value was similar to that reported by a Dutch study, where 32% of the 41 infants with congenital infection diagnosed by Guthrie card was genotype 3 ²⁷⁵. Despite the geographical distribution, our frequency pattern resembled an Indian study, where genotype 3 appeared more frequently (49.2%), followed by genotype 1 (24.4%), and 2 (22.4%). However, it was not found genotype gB4 in 78 subjects studied, while 9.1% of our population was present. Some European studies have established the genotype gB1 as the most prevalent genotype: Netherlands (46%) ⁸¹, Southern Poland (63.5%) ²⁷⁶, South Hungary (100%) ²⁸³, and Central Poland (~ 50%) ⁸⁰. In Mexico, it was observed that 76.5% of the study population had genotype gB2 ⁷⁹. In our case, genotype gB2 (25.4%) and 4 (9.1%) were present, even in certain series, genotype gB4 occurred with a frequency of 13% ⁸² and 28.8% ²⁷⁶, and it did not appear as a single genotype, but mixed si ⁷⁹. In this study we identified that about 3.6% of patients with congenital infection had mixed

genotypes of glycoprotein B. These mixed infections have rarely been described until 2012^{276,277,284,285}. In fact, other authors have not observed this phenomenon in congenital infection^{37,78,100}. Afterwards, there have been reported rates ranging from 2%²⁸⁵, 7.5%²⁷⁷, 12.5%⁸⁰, 16%²⁷⁶, 45%⁸². In our study, in all patients who had more than one sample, showed the same genotype. In contrast, a study demonstrated that in which different compartments as saliva, blood and urine there were different genomic variants including mixed genotypes detected²⁸³. The gB3 genotype was more common in congenital infection, while gB1 genotype in acquired infection. This coincides with a previous Japanese study,³⁷ however, some studies found a greater prevalence of gB1 than our study (40%) with rates between 45-84.3%^{72,275,294-296} in transplant recipients. Several authors have suggested that none of the genotypes of gB (UL55) are associated with clinical evolution^{81,82,100,275,279,284,313}. In this study, we found that the periventricular cysts on imaging tests to children with suspected congenital infection was more common with gB2 genotype ($p = 0.05$), and genotype gB3 was not frequent in motor involvement ($p = 0.02$). Recently, gB3 has been associated with severe manifestations in children with congenital infection as neurological abnormalities or sensorineural loss³⁷. These authors explained that the inconsistent data from other studies in which no association was found, could be explained in part to the geographic and demographic distribution, lack of a proper control group for comparison, and the small population size.

The most prevalent genotype was gH1 (55.35%) in congenital infection, similar to the reported rate by Pati et al⁸² (56%), and less than a Japanese study where the frequency was higher than 60%²⁸⁷. This prevalence was higher

than in United States (39%)²⁸³ and in several European papers carried out in the Netherlands (38%)²⁷⁵ or Poland (40.4%)⁹². Mixed genotypes have been previously described in American studies, in which the rate of 15% was established over a study period of eight years⁸². There were no mixed genotypes in two studies of Ross et al²⁸⁴ and De Vries et al²⁷⁵ between the years 2007-2009 and 2009-2011, respectively. In our case, one child (1.8%) had a mixed genotype. These differences in frequency of both single or mixed genotypes, as with glycoprotein B genotypes, could be explained by a possible selection of the virus strain in cell culture, by the inability to detect these different methodology used, or by the different cellular tropism (which is conferred by certain genes present in clinical isolates, which might explain the differences in the biological compartment of different viral strains). There were no differences in gH genotype distribution between congenital and acquired infection in this study. This rate was similar to that reported by Grosjean et al (51.5%), when analyzed 212 samples of saliva from different French children who was admitted to the emergency department²⁹⁰, and slightly less than two Japanese papers (71%³⁰⁸ and 60.8%³⁰⁹). In transplant recipients, our rate (35.8%) was lower than that reported by Madi et al (71%)⁷² showing the genotype gH1 as the most prevalent among patients receiving kidney transplantation in Kuwait. These results and ours contrast with a Dutch study,²⁷⁵ where the frequency of the genotype distribution of glycoprotein H was similar among hematopoietic stem cell transplantation patients, kidney and liver recipients (50% gH1 *versus* 50% gH2). In our study, the ocular manifestations was more frequent with gH2 genotype ($p = 0.01$). This result could not be

compared with other studies because of the literature about the association of this glycoprotein and evolution is very scarce.

In this study, all UL144 genotypes in congenital infection were detected, except the recombinant A/B and B/C. The most prevalent UL144 genotype was UL144 B (41.5%). This differs with regard to an Irish study in which all genotypes were detected except B/C, the predominant genotype was UL144 A (33.3%), and none of them prevailed during the study period consisting of two years (2006- 2007) ²⁸. Our frequency pattern was similar to that shown by an American article that included 66 pregnant women, which were part of a program of prenatal diagnosis between 1990 and 2003. This showed that UL144 B was present in 44.6% the sequenced amniotic fluids and like us, recombinant UL144 genotypes as A/B and B/C were not represented ³⁴. Many series UL144 genotypes detected recombinant genotypes ^{34,52,82,100,289}, except a Japanese study that none of them were detected ³⁷. The representation of UL144 genotype A/C (15.09) was higher in our study, differing with other articles which rates ranging from 3% ⁵², 3.7% ²⁸⁹, 5.4% ³⁴, to 10% ⁸². The most prevalent genotype in both populations was UL144 B, although the proportion of this in acquired infection was lower (30% *versus* 41.5%). This finding has been previously referred to in France ⁵², United States ⁴⁹⁻⁵¹ and The Netherlands ⁸¹. Picone et al ⁵² included 38 patients with congenital infection and 30 of solid organ or bone marrow recipients, where they observe that this genotype is more prevalent with a rate very similar to ours (congenital infection 34% *versus* infection 37%). However, our proportion and French ⁵² and Dutch ⁸¹ studies were lower than those established by the US, which reported a frequency of between 51 and 69% ⁴⁹⁻⁵¹. This differs with Waters et al ²⁸⁹, an Irish article in

which the study population was similar to us, consisted of patients with congenital, postnatal and adult (transplant, HIV, and dialysis patients with chronic infections or infection respiratory tract). We found that UL144 C was more common in pregnant younger and primiparous ($p = 0.01$), while unilateral hearing loss was more common with UL144 genotype A/C ($p = 0.03$). However, UL144 B was more frequent in older women ($p = 0.04$) and splenomegaly as finding extracerebral in fetus ($p = 0.04$). Many articles do not establish an association between a specific genotype of UL144 and evolution of congenital infection^{37,51,52,81,82,97,310}. Lurain et al described no association of a particular genotype UL144 and evolution, even though the most prevalent genotype was UL144 B (group 3)⁵¹. Bale et al also did not confirm the association between genotypes and evolution UL144 intrauterine hCMV infection in a small group of children with congenital infection, however, the distribution of the different genotypes were not described in the study⁵⁰.

Considering the limitations of the study, we need multicenter studies of children with congenital infection with years of follow, strict definition of symptomatic and asymptomatic CMV infection, specific measures of evolution disease, and the use of technologies such as pyrosequencing, to clarify the diagnostic role of these markers in the disease.

CONCLUSIONS: All genotypes of glycoprotein B, glycoprotein H and UL144 can be transmitted from mother to child, and they are able to generate symptoms. There is a great diversity in hCMV strains that can cause congenital infection as a single genotype. Multiple genotypes infection is more common in patients with acquired infection and in transplant recipients than congenital infection. Some genotypes were more or less significantly common in certain

manifestations in congenital infection, but an association was not established, although different associations were found in transplant recipients.

RESUMEN EN ESPAÑOL

TÍTULO: *Citomegalovirus* congénito: análisis de los genotipos virales

INTRODUCCIÓN: *Citomegalovirus* humano (CMVh) infecta a muchos tipos de células dando lugar a un rango diverso de manifestaciones clínicas sugiriendo que la evolución clínica puede estar relacionada con la variación genética entre las cepas y la respuesta inmune del hospedador. Las técnicas diagnósticas utilizadas en la actualidad no nos permiten identificar que pacientes infectados desarrollarán secuelas; sin embargo, la evidencia disponible hasta la fecha sugiere que tanto los factores del hospedador y factores virales como la inmunidad maternal, la carga viral en el líquido amniótico o el tipo de cepa de CMVh, pueden contribuir a la evolución de la infección congénita, siendo recientemente la carga viral propuesta como un buen marcador predictivo y pronóstico de la severidad de la enfermedad especialmente de la pérdida auditiva y las manifestaciones sistémicas, pero aún se desconoce que genes influyen en las cargas virales. Aproximadamente veinte Open Read Fragments han demostrado exhibir variabilidad nucleotídica en diversos estudios estableciendo la existencia de diferentes grupos o genotipos. Si esta variabilidad contribuye a la evolución de la infección por CMVh en general y a la infección congénita en particular, está actualmente en pleno debate.

HIPÓTESIS: El estudio de los diferentes genotipos de las diferentes genes que codifican las proteínas de la envoltura como gB, gH, y el homólogo del receptor del factor de necrosis tumoral UL144, y su correlación con la severidad y curso clínico de la infección, nos ayudarán a establecer qué marcadores de virulencia

deben ser monitorizados con fines pronósticos, y a la adecuación de la duración del tratamiento antiviral cuando esté indicado.

OBJETIVOS: Los objetivos de este estudio fueron: 1) Analizar la frecuencia de presentación de los diferentes genotipos de proteínas de la envuelta (UL55, gB; UL75, gH) y UL144 en embarazadas y pacientes con infección congénita por CMVh; 2) comparar la distribución de estos genotipos en un grupo control de pacientes pediátricos mayores de 2 meses en los que se ha documentado primoinfección por CMVh y en receptores de trasplante de órgano sólido; 3) relacionar los genotipos encontrados en los pacientes con infección congénita con la severidad de las manifestaciones clínicas, y por último, 4) estudiar la asociación entre alguno de los genotipos y la presentación de cargas virales elevadas.

MATERIAL Y METODOS: Se trata de un estudio retrospectivo observacional caso control realizado en el Hospital 12 de Octubre de Madrid. Se incluyeron todas las muestras de pacientes remitidas al laboratorio de Virología para el diagnóstico prenatal o postnatal de infección congénita por CMVh en el período comprendido entre Enero de 2002 y Diciembre de 2013. El grupo control estuvo constituido por muestras procedentes de 40 pacientes pediátricos mayores de 2 meses de edad con sospecha de primoinfección por CMVh. Además se estudiaron 162 muestras de sangre periférica provenientes de 62 receptores de trasplante de órgano sólido. Se recogieron una serie de datos demográficos, clínicos, analíticos, radiológicos y microbiológicos. Se llevó a cabo cultivo celular convencional y/o shell-vial y/o detección de ácidos nucleicos de los diferentes tipos de muestra. Tras la descontaminación, las muestras fueron inoculadas en la línea celular MRC-5 (Vircell, S.L., Genoma, Spain), incubadas

a 37°C, y evaluado el efecto citopático durante 7 días. Los virus fueron clasificados mediante anticuerpos monoclonales contra la proteína 72 KD de CMV, detectando los antígenos immediate-early (Bio-Rad Laboratories, Francia). Un total of 500µl of cada muestra fue extraída usando el sistema Nuclisense EasyMag® instrument (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los primers y sondas usados para la detección cualitativa y cuantitativa, así como para el genotipado de CMV fueron previamente descritos. La amplificación fue llevada a cabo en los sistemas de PCR en tiempo real LightCycler® 2.0 real-time or LightCycler® 480 II (Roche Diagnostic, Spain). Para el genotipado de UL144 se utilizó PCR en tiempo real, se agruparon los genotipos atendiendo a las diferentes temperaturas de melting, y varios representantes de cada grupo fueron secuenciados. La secuenciación fue realizada mediante ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EEUU). Las secuencias obtenidas fueron analizadas y ensambladas mediante la herramienta informática programa Geneious (Invitrogen, EEUU). Los datos se analizaron con el programa informático SPSS versión 17.0 (SPSS, Chicago, EEUU), Epi Info™ versión 3.5.4 (CDC; Atlanta, EEUU) y Epidat 3.0 (Pan American Health Organization).

RESULTADOS: Se incluyeron 56 pacientes con sospecha de infección congénita, 39 niños y 17 embarazadas. La mediana [Rango intercuartílico (RI)] de edad a la cual se llevó a cabo el diagnóstico de infección congénita en niños fue de 9 [3 – 39,5] días. Veintisiete de los niños con infección congénita fueron sintomáticos. Los hallazgos ultrasonográficos obtenidos mediante ecografía y/o RMN cerebral mostraron 20 (51.3%) alteración y 10 (25.6%) normalidad en los

30 pacientes en los que se realizó pruebas de imagen, respectivamente. Veinticinco (64.1%) pacientes manifestaron algún tipo de secuela en el neurodesarrollo, siendo la alteración auditiva la más frecuente seguida del retraso psicomotor, déficit visual y microcefalia. Entre las 17 gestantes con diagnóstico prenatal de infección congénita, 11 (64.7%) pacientes mostraron hallazgos extracerebrales siendo los más frecuentes hepatomegalia (52.9%), cardiomegalia (47.05%), ascitis (23.5%), placentomegalia (23.5%), y esplenomegalia (17.6%). Los hallazgos cerebrales estuvieron presentes en 12 fetos (70.6%), donde la hiperecogenicidad puntiforme parenquimatosa (29.4%) y la ventriculomegalia (23.5%) fueron los más frecuentes.

El genotipo de glicoproteína B más prevalente en infección congénita fue gB3 (34.5%), seguido de gB1 (27.3%), gB2 (25.4%), y gB4 (9.1%), y se detectó un 3.6% de infecciones mixtas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros analíticos, características clínicas, cargas virales y el genotipo de glicoproteína B, salvo con el genotipo gB3 en el que la afectación motora fue menos frecuente ($p=0.02$) y el genotipo gB2 en el que fue más frecuente la presencia de quistes periventriculares ($p=0.05$). Cuando se comparaban infección congénita e infección adquirida, se pudo observar que gB3 era más frecuente en infección congénita ($p = 0.01$), y gB1 en infección adquirida ($p = 0.01$), que además presentaba un porcentaje de genotipos mixtos del 10%. En trasplante de órgano sólido, el genotipo mayoritario fue gB1 (38.9%) y se detectaron 6.8% de infecciones por genotipos múltiples. El genotipo gB1 estuvo asociado a no tener una determinación de anticuerpos anti-CMV IgG pretrasplante positiva ($p = 0.004$), al desarrollo de síndrome viral ($p = 0.01$), y a presentarse la infección por CMVh de manera más anticipada

tras el trasplante ($p = 0.02$) que el resto de genotipos. El genotipo gB2 estuvo asociado a síndrome viral ($p = 0.03$), y a presentar mayor carga viral en células que el resto de genotipos ($p = 0.02$). El genotipo gB3 estuvo asociado a tener anticuerpos anti-CMV IgG pretrasplante positivos ($p = 0.01$), a viremia asintomática ($p < 0.001$), y a presentar menor valor de antigenemia ($p = 0.001$), carga viral en células ($p < 0.001$) y plasma ($p = 0.04$) que el resto de genotipos. El genotipo gB4 solamente estuvo asociado a presentar menor carga viral que el resto de genotipos ($p = 0.01$).

El genotipo de glicoproteína H más prevalente en infección congénita fue gH1 (55.35%) seguido de gH2 (41.07%). Se detectó en un niño (1.8%) una infección por ambos genotipos (gH1-gH2). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros analíticos, las variables estudiadas, las cargas virales y los diferentes genotipos, salvo con el genotipo gH2, el cual fue más frecuente en aquellos pacientes con afectación ocular ($p = 0.01$), y gH1 se presentó en gestantes de mayor edad. En infección adquirida, el genotipo de glicoproteína H más prevalente fue gH1 (55%) seguido de gH2 (37.5%), y se detectó un 5% de genotipos mixtos. Ningún genotipo prevaleció sobre el otro (gH1 $p = 0.99$ y gH2 $p = 0.74$) cuando se comparaban las poblaciones de infección congénita y adquirida, sin embargo, las infecciones por múltiples genotipos fueron más frecuentes (5%) en infección adquirida ($p = 0.37$). En trasplante de órgano sólido, la distribución de los genotipos de glicoproteína H fue gH1 (35.8 %) y gH2 (29.62%), y se detectaron 31.48% genotipos mixtos. El genotipo gH1 fue más frecuente en aquellos pacientes con una determinación de anticuerpos anti-CMV IgG pretrasplante positiva ($p = 0.007$), con viremia asintomática ($p = 0.01$), y además la infección por CMVh

se presentó más tarde que con el resto de genotipos ($p < 0.001$). En el genotipo gH2 fue más frecuente el no tener anticuerpos anti-CMV IgG pretrasplante positivos ($p = 0.004$), el síndrome viral ($p = 0.004$), y el presentar mayor carga viral plasmática que el resto de genotipos ($p = 0.01$). El genotipo mixto gH1-gH2 fue más frecuente en aquellos pacientes con una determinación de anticuerpos anti-CMV IgG pretrasplante positiva ($p = 0.001$), y la infección pareció anticiparse tras el trasplante cuando se comparaba con el resto de genotipos ($p < 0.001$).

El genotipo de UL144 más prevalente en infección congénita fue UL144 B (41.50%) seguido de UL144 C (22.64%), UL144 A (20.75%), y UL144 A/C (15.09%). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros analíticos, las variables estudiadas, las cargas virales y los diferentes genotipos, salvo con el genotipo UL144 A/C, donde era más frecuente presentar hipoacusia unilateral con respecto al resto de genotipos ($p = 0.03$). Además, en las mujeres embarazadas, el genotipo UL144 C fue más frecuente en mujeres embarazadas de menor edad, y se presentaba con mayor frecuencia en primigestas, mientras que el genotipo UL144 B en mujeres de mayor edad, y se presentaba con mayor frecuencia la esplenomegalia como hallazgo extracerebral. El genotipo de glicoproteína UL144 en infección adquirida más prevalente fue UL144 B (30%) seguido de UL144 A (22.4%), UL144 A/C (30%), UL144 C (12.5%), y UL144 A/B (2.5%). Ningún genotipo prevalecía sobre los otros cuando se comparaban los niños con infección congénita y adquirida. En trasplante, la distribución de los genotipos de UL144 fue UL144 A (3.7%), UL144 B (79.6%), UL144 C (4.3%), y UL144 A/C (3.08%). No se encontró relación alguna con las diferentes características clínicas, salvo

el genotipo UL144 C que se encontró de manera menos frecuente en aquellos pacientes con viremia asintomática ($p = 0.04$).

DISCUSIÓN: El genotipo de glicoproteína B más prevalente en infección congénita fue el genotipo 3, el cual estuvo presente en más de un tercio de la población estudiada (34.5%), que junto con el genotipo 1 aportaban aproximadamente el 60% de los casos estudiados. Este valor de frecuencia era similar al reportado por un estudio holandés, donde el 32% de los 41 recién nacidos con infección congénita diagnosticados mediante tarjeta de pruebas metabólicas era genotipo 3 ²⁷⁵. A pesar de la situación geográfica, nuestro patrón de frecuencia se asemejaba al de un estudio indio, en donde el genotipo 3 se presentaba con mayor asiduidad (49.2%), seguido del genotipo 1 (24.4%), y 2 (22.4%). Sin embargo, no encontraron el genotipo 4 en los sujetos que estudiaron ⁷⁸, mientras que en el 9.1% de nuestra población estuvo presente. Diversos estudios realizados en el resto de Europa, como en Holanda (46%) ⁸¹, Sur de Polonia (63.5%) ²⁷⁶, Sur de Hungría (100%) ²⁸³, Centro de Polonia (~50%) ⁸⁰, percibieron que el genotipo 1 era el más prevalente. En México, el 76.5% de la población estudiada presentaba el genotipo gB2 ⁷⁹. En nuestro caso, los genotipos 2 (25.4%) y 4 (9.1%) si estuvieron presentes, hasta en determinadas series, el genotipo 4 acontecía con frecuencias del 13% ⁸² y del 28.8% ²⁷⁶, incluso en algunas no aparecía como genotipo único, pero si mixto ⁷⁹. Por lo que nuestro estudio demostró, que cualquiera de los genotipos de glicoproteína B, pueden ser transmitidos de madre a hijo. en este estudio detectamos que alrededor del 3.6% de los pacientes con infección congénita presentaban genotipos mixtos de glicoproteína B. Estas infecciones mixtas han sido raramente descritas hasta el año 2012 ^{276,277,284,285}, de hecho, otros

autores no han observado este fenómeno ^{37,78,100} en infección congénita. Posteriormente a ese año, se han referido tasas de infección mixta que variaban desde el 2% ²⁸⁵, 7.5% ²⁷⁷, 12.5% ⁸⁰, 16% ²⁷⁶ hasta el 45 % ⁸². En nuestro estudio, todos los pacientes que tenían más de una muestra y diferente tipo de muestra presentaron el mismo genotipo en todas ellas, en su contra, un estudio en el que se analizaban diferentes compartimentos como saliva, sangre y orina mostraba diferentes variantes genómicas, detectándose incluso genotipos mixtos ²⁸³.

El genotipo 3 de glicoproteína B era más habitual en infección congénita, mientras que el genotipo 1 en infección adquirida. Este hecho coincide con un estudio japonés previo, en el que se incluyeron 64 niños, de los cuales 31 fueron diagnosticados de infección adquirida con edades comprendidas entre los 6 meses y 2 años y medio ³⁷. Aunque algunos estudios encuentran una mayor predominancia de gB1 que nuestro trabajo, con tasas de entre el 45-84.3% ^{72,275,294-296}, aproximadamente el 40% de las cepas que estudiamos presentaron genotipo 1 en receptores de trasplante.

Diversos autores han sugerido que ninguno de los genotipos de gB (UL55) están asociados con la evolución de infección por CMVh ^{81,82,100,275,279,284,313}. En este estudio, encontramos que el presentar quistes periventriculares en las pruebas de imagen realizadas a niños con sospecha de infección congénita fue más frecuente con el genotipo gB2 ($p = 0.05$), y que con el genotipo gB3 no era frecuente presentar afectación motora ($p = 0.02$). Recientemente, el genotipo 3 de UL55 ha sido asociado con manifestaciones severas de CMVh en niños con infección congénita como anomalías neurológicas o pérdida neurosensorial ³⁷. Estos autores reseñan que parte de

los datos inconsistentes de otros estudios en los que no se encuentra asociación, podrían ser explicados en parte, a la distribución geográfica y demográfica, a la falta de un apropiado grupo control para comparaciones, y al pequeño tamaño poblacional. Además, el genotipo gB2 ha sido asociado a déficit auditivo y síntomas a nivel del SNC ⁷⁸.

El genotipo de glicoproteína H más prevalente fue gH1 (55.35%), tasa similar a la referida por Pati et al ⁸² (56%), e inferior a un estudio japonés donde la frecuencia era superior al 60% ²⁸⁷. Esta asiduidad fue superior a la expuesta por Estados Unidos ²⁸³ (39%), y en diversos trabajos europeos llevados a cabo en Holanda, Polonia, en los que era del 38% ²⁷⁵ y 40.4% ⁹², respectivamente. Los genotipos mixtos de glicoproteína H han sido descritos previamente en uno de los estudios americanos, en el que se establecía una tasa del 15% en un período de estudio de 8 años ⁸². Ninguna mezcla de genotipos fueron reseñados en sendos estudios de Ross et al ²⁸⁴ y De Vries et al ²⁷⁵ entre los años 2007-2009 y 2009-2011, respectivamente. En nuestro caso, un único niño (1.8%) presentó un genotipo mixto. Estas diferencias en la frecuencia tanto de genotipos únicos o mixtos, al igual que con los genotipos de glicoproteína B, podrían ser explicadas por una posible selección de la cepa viral en los cultivos celulares, por la incapacidad de detectar las mismas por la diferente metodología usada, o por el diferente tropismo celular (el cual es conferido por determinados genes presentes en las cepas clínicas, lo que podría explicar esas diferencias en el compartimento biológico de diferentes cepas virales). No existieron diferencias en la distribución del genotipo de gH en infección congénita y adquirida. Esta frecuencia fue similar a la referida por Grosjean et al para gH1 (51.5%) cuando analizaban 212 muestras de saliva pertenecientes

a diferentes niños franceses que acudían al servicio de urgencias o guarderías²⁹⁰, y ligeramente inferior a dos trabajos japoneses en los que las tasas eran del 71%³⁰⁸ y 60.8%³⁰⁹. Nuestra tasa (35.8%) fue inferior a la referida por Madi et al (71%)⁷² que muestran el genotipo H1 como el más prevalente entre los pacientes receptores de trasplante renal en Kuwait. Este resultado y el nuestro contrastan con un estudio holandés²⁷⁵, donde la frecuencia de distribución del genotipo de glicoproteína H era similar en receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos, renales, y hepáticos²⁷⁵ (~ gH1 50% *versus* gH2 50%). En nuestro estudio, el presentar manifestaciones oculares fue más frecuente con el genotipo gH2 (p=0.01). Este resultado no ha podido ser comparado con otros trabajos ya que la literatura acerca de la asociación de esta glicoproteína y evolución es escasa.

En este estudio, todos los genotipos de UL144 en infección congénita fueron detectados, salvo los recombinantes A/B y B/C. El genotipo de UL144 más prevalente fue UL144 B (41.5%). Esto difiere con lo referido por un estudio irlandés en el que todos los genotipos fueron detectados salvo B/C, el genotipo predominante fue UL144 A (33.3%), y ninguno de ellos predominaba durante el período estudiado que constaba de 2 años (2006-2007)²⁸⁹ en 29 muestras de orina de niños con infección congénita. Nuestro patrón de frecuencia fue similar al mostrado por un artículo americano en el que se incluían 66 mujeres embarazadas, las cuales se encontraban dentro de un programa de diagnóstico prenatal entre los años 1990 y 2003. Este mostraba que UL144 B estaba presente en el 44.6% de los líquidos amnióticos secuenciados y al igual que nosotros, los genotipos UL144 recombinantes como A/B y B/C no se encontraban representados³⁴. Muchos de las series arriba mencionadas

detectaron genotipos recombinantes de UL144 ^{34,52,82,100,289}, salvo el estudio japonés ³⁷ que no detectó ninguno. La representación del genotipo UL144 A/C (15.09) fue superior en este estudio a diferencia de la especificada en otros trabajos, cuyas tasas variaban desde el 3% ⁵², 3.7% ²⁸⁹, 5.4% ³⁴ hasta el 10% ⁸².

El genotipo más prevalente en infección congénita y adquirida fue UL144 B, aunque la proporción de este fue inferior en infección adquirida (30% *versus* 41.5%). Este hallazgo ha sido previamente referido en Francia ⁵², Estados Unidos ⁴⁹⁻⁵¹ y Holanda ⁸¹. Picone et al ⁵² incluye 38 pacientes con infección congénita y 30 receptores de trasplante de órgano sólido o médula ósea, donde observan que este genotipo es el más prevalente con una tasa muy similar a la nuestra (infección congénita 34% *versus* trasplantados 37%), no encontrando UL144A/B en trasplantados. Sin embargo, nuestra proporción y la del estudio francés ⁵² y holandés ⁸¹ (44% infección adquirida), fueron inferiores a las establecidas por el estadounidense, en el que refieren una frecuencia de entre el 51 y 69%. Esto difiere con el estudio de Waters et al ²⁸⁹, un trabajo irlandés en el que la población de estudio al igual que nosotros, constaba de pacientes con infección congénita, postnatal y adultos (trasplantados, VIH, y pacientes en diálisis o con infecciones crónicas del tracto respiratorio).

En nuestro estudio, encontramos que UL144 C era más frecuente en gestantes de menor edad y en primigestas de manera significativa ($p = 0.01$), mientras que la hipoacusia unilateral fue más habitual con el genotipo UL144 A/C ($p = 0.03$). Sin embargo, UL144 B era el más frecuente en niños con infección congénita y en gestantes con diagnóstico prenatal de infección congénita pero de manera no significativa, presentándose en púerperas de

mayor edad ($p=0.04$) y siendo frecuente la esplenomegalia como hallazgo extracerebral en las pruebas de imagen realizadas en las ecografías trimestrales ($p = 0.04$). Muchas series no establecen una asociación entre un genotipo específico de UL144 y la evolución de infección congénita^{37,51,52,81,82,97,310}. Lurain et al describen la no asociación de un genotipo determinado de UL144 y la evolución, a pesar de que el genotipo más prevalente fue UL144 B (grupo 3)⁵¹. Bale et al también confirman la no asociación entre los genotipos de UL144 y la evolución de la infección intrauterina por CMVh en un pequeño grupo de niños con infección congénita, sin embargo, la distribución de los diferentes genotipos no se describe en el estudio.⁵⁰.

Teniendo en cuenta las limitaciones del estudio, son necesarios estudios multicéntricos de niños con infección congénita con años de seguimiento, definición estricta de enfermedad de CMVh sintomática y asintomática, medidas de evolución concretas, y el uso de tecnologías como la pirosecuenciación, para poder esclarecer el papel diagnóstico de estos marcadores en la enfermedad.

CONCLUSIÓN: Todos los genotipos de glicoproteína B, glicoproteína H y UL144 pueden ser transmitidos de madre a hijo, y todos ellos son capaces de generar síntomas. Existe una gran diversidad en las cepas de *Citomegalovirus* humano que pueden causar infección congénita como genotipo único, y la infección por múltiples genotipos es más común en pacientes con infección adquirida y en receptores de trasplante que en infección congénita. Determinados genotipos fueron más o menos frecuentes en algunas patologías de manera significativa, pero no se encontró asociación alguna en infección

congénita, aunque en trasplante si se encontró asociación entre las manifestaciones clínicas y los genotipos de gB y gH.

I.INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES

Los virus Herpes forman un grupo muy importante y extenso de agentes infecciosos, los cuales pueden causar un amplio rango de síndromes. Hasta la fecha, se han descrito alrededor de 120 especies diferentes. La familia *Herpesviridae*, contiene aquellos virus Herpes que infectan a humanos así como a mamíferos, pájaros y reptiles. Esta familia a su vez, se divide en tres subfamilias: *Alphaherpesvirinae* (Virus *Herpes Simplex* tipo 1, Virus *Herpes Simplex* tipo 2, Virus Varicela-Zóster), *Betaherpesvirinae* (*Citomegalovirus*, *Herpesvirus* humano tipo 6, *Herpesvirus* Humano tipo 7) y *Gammapherpesvirinae* (Virus *Epstein-Barr*, *Herpesvirus* humano tipo 8).

El *Citomegalovirus* humano (CMVh) presenta una amplia distribución mundial y es especie específico. Fue descrito por primera vez en los años 1930 asociado a la enfermedad de inclusiones citomegálicas en niños e identificado como el agente causal de dicha enfermedad por Thomas Weller en 1957 ¹. Tiene tropismo por las células endoteliales, células epiteliales, células del músculo liso, fibroblastos, macrófagos, y células dendríticas ². CMVh es un virus que se caracteriza por su ciclo lento de replicación, por el desarrollo de inclusiones intracitoplasmáticas e intranucleares (**Figura 1**), por la capacidad de inducir latencia principalmente en la línea celular mieloide, y de reactivarse. Es un virus lábil que puede ser inactivado por exposición a solventes lipídicos (éter, cloroformo), detergentes, pH ácido (< 5), desinfectantes (lejía, glutaraldehído), radiaciones ultravioleta y temperaturas superiores a 56°C durante 30 minutos. Se debe conservar a temperaturas inferiores a -70°C para

INTRODUCCIÓN

preservar su viabilidad, teniendo en cuenta que cuando se congela durante períodos prolongados a -20°C , el virus pierde completamente su infectividad ³.

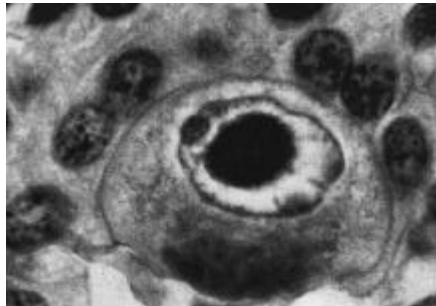


Figura 1. Ilustración de células citomegálicas infectadas con inclusiones intranucleares (adaptado de Ho M [4])

1.2 DESCRIPCIÓN DEL VIRUS (Estructura y formación del virión)

La estructura del virión se compone de dentro hacia fuera (230 nm) de (Figura 2) ⁵:

- a) Nucleocápside
- b) Tegumento
- c) Envoltura lipídica trilaminada

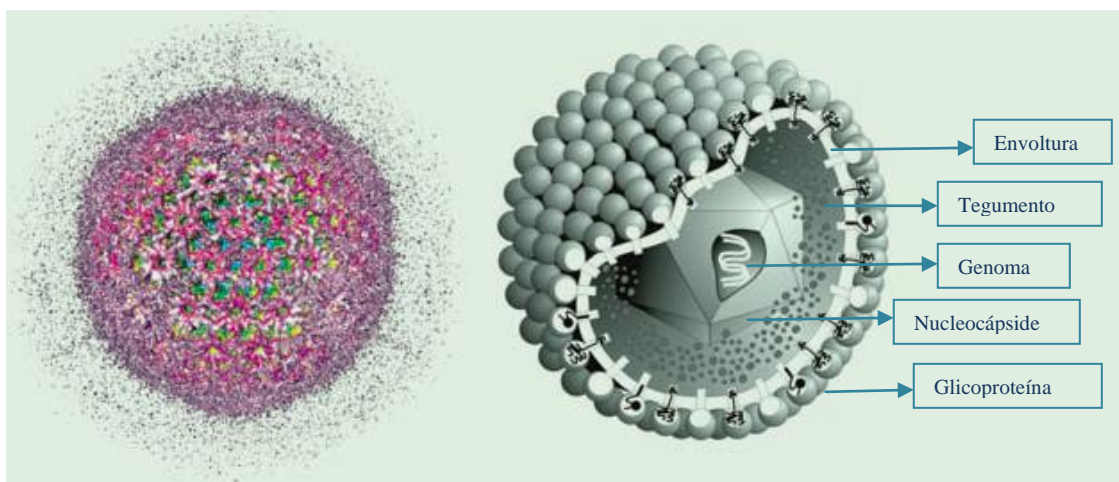


Figura 2. Estructura del virión de CMVh (adaptada de Gandhi et al [6])

INTRODUCCIÓN

1.2.1 Nucleocápside

Contiene el ADN de doble cadena lineal más complejo y más largo de los *Herpesvirus* humanos, midiendo aproximadamente 236-kpb. Se estima que su tamaño es 50% más grande que el virus herpes simple tipo 1. La cápside es icosaédrica, y mide aproximadamente 110-130 nm de diámetro. Esta cápside está compuesta de 5 proteínas integrales esenciales (pUL46, pUL80.5, pUL85, pUL86, pUL104), que están dispuestas dentro de 162 capsómeros (150 hexámeros más 12 pentámeros), y 320 tripletes localizados entre los capsómeros ⁷⁻¹⁰.

1.2.2 Tegumento

Es una estructura generalmente amorfa de aproximadamente 50 nm de grosor que incluye 7 proteínas relativamente abundantes. Más de la mitad de las 71 proteínas virales encontradas dentro de las partículas infecciosas son componentes del tegumento. Estas proteínas juegan un papel importante en la entrada viral, expresión génica, evasión inmune (respuesta intrínseca, innata y adaptativa), ensamblaje y liberación (**Tabla 1**).

Los mecanismos por los cuales las proteínas del tegumento son incorporadas dentro de los viriones continúa siendo un enigma. La fosforilación, la localización subcelular del sitio de ensamblaje, la interacción con las cápsides, así como la formación de complejos heterólogos de alto orden parecen facilitar dicha incorporación.

Después de que las glicoproteínas virales interaccionan con los receptores celulares de fibroblastos, el virión y las membranas celulares liberan la cápside, y las proteínas del tegumento son incorporadas al citoplasma. Una de estas

INTRODUCCIÓN

proteínas, pp65 (ppUL83), es el mayor constituyente de las partículas de CMVh, y es dispensable para la replicación en los cultivos de fibroblastos, pero esencial para la formación de los cuerpos densos. Entre sus funciones está la de mediar en la fosforilación de proteínas virales immediate-early, proteger a las células infectadas de la inmunidad natural mediante inhibición de la citotoxicidad celular mediada por las Natural Killer, y tener actividad quinasa viral y celular, pudiendo ser esta endógena ¹¹⁻¹³.

Tabla 1. Listado de proteínas del tegumento de CMVh (adaptado de [14])

Gen (Proteína)	Función	Gen (Proteína)	Función
UL23	Desconocida	UL72	¿Inactivar dUTPasa?
UL24	Desconocida	UL76	¿Función nuclear?
UL25	Situada junto con pp28	UL77	Piruvildescarboxilasa
UL26	Aumenta la estabilidad de las proteínas del virión	UL79	Desconocida
ppUL32 (pp150)	Dirige la cápside al sitio de envoltura final	ppUL82 (pp71)	Facilita la expresión génica immediate early/ Estimula la progresión del ciclo celular/ Previene la expresión de la superficie celular del MHC
ppUL35	Activa la expresión génica viral	ppUL83 (pp65)	Actividad quinasa endógena/ Actividad quinasa asociada/ Evasión de inmunidad adaptativa e innata
UL36	Inhibe la apoptosis	UL84	Factor de transcripción/ replicación ADN
UL38	Inhibe la apoptosis	UL88	Desconocida
UL43	Desconocida	UL93	Desconocida
UL44	Factor de transcripción/procesamiento de ADN polimerasa	UL94	Proteína unión al ADN que junto con pp28 facilita la envoltura de las cápsides tegumentadas en el citoplasma
UL45	¿Inactivar la subunidad ribonucleotido reductasa?	UL96	Desconocida
UL47	Liberación del ADN viral de la cápside	ppUL97	Fosfoquinasa del ganciclovir/ Estimula la replicación del ADN viral/ Ensamblaje/ Salida
UL48	Desubiquitinación proteasa/ Liberación del ADN viral de la cápside	ppUL99 (pp28)	Dirigir el cierre de las partículas virales envueltas
UL50	Salida nuclear de la cápside	UL103	Desconocida
UL53	Salida nuclear/ Ensamblaje de la cápside	UL112	Factor de replicación ADN
UL54	ADN Polimerasa viral	IRS1/TRS1	Regulación transcripcional/inhibir la respuesta antiviral PKR/ Ensamblaje viral/ Evasión inmune
UL57	Proteína unión al ADN	US22	Desconocida
ppUL69	Salida nuclear de los ARNm sin splicing	US23	Desconocida
UL71	¿Envoltura secundaria?	US24	Activa la expresión génica viral

Entre el tegumento y la envoltura existen proteínas celulares, fosfolípidos, poliaminas y pequeños ARNs. Además, mediante microscopía electrónica se observan otros cinco tipos de partículas virales, 3 de ellas son intracelulares y no envueltas como A-cápsides, B-cápsides, y C-cápsides. Las A-cápsides y B-cápsides son recuperadas del núcleo de células infectadas por CMV mediante tratamiento con NP-40. La primera de ellas está compuesta por cuatro proteínas integrales organizadas en una estructura simple; mientras que las B-cápsides además contienen otras proteínas internas. Las C-cápsides son recuperadas del citoplasma mediante el mismo tipo de tratamiento y están

INTRODUCCIÓN

compuestas de ADN localizado dentro de una A-cápside que tiene ligeramente adheridas algunas proteínas del tegumento (pUL32, pUL47 y pUL48). Los otros dos tipos de partículas son envueltas y no contienen ADN siendo recuperadas de los medios de cultivo de células infectadas por CMV. Las partículas envueltas no infecciosas o defectivas (en inglés, non infectious enveloped particles, NIEPs) contienen proteínas de la envoltura (B-cápside), tegumento, y cápside; mientras que los cuerpos densos (en inglés, dense bodies, DBs) se caracterizan por ser agregados esferoidales de la proteína del tegumento mencionada anteriormente pUL83 (pp65), ausentes de nucleocápside, y de mayor tamaño y heterogeneidad (250-600nm) que los NIEPs y viriones ¹³.

1.2.3 Envoltura lipídica

Es una estructura de 10 nm de grosor en cuya parte externa están ancladas unas proyecciones espiculares de codificación vírica y naturaleza glicoproteica. Estas glicoproteínas resultan del clivaje de una poliproteína precursora presente en las células infectadas. Una vez que estas glicoproteínas entran en la célula hospedadora, se quedan en el retículo endoplásmico de Golgi y cuando se realiza el ensamblaje final de los nuevos viriones, estas proteínas vuelven a incorporarse a la estructura del virus. Se han descrito alrededor de 25 (**Tabla 2** ^{8,15}) y desempeñan un papel fundamental durante las primeras fases de la replicación viral como mediadores de la adhesión y penetración del virus a la célula hospedadora ^{16,17}.

INTRODUCCIÓN

Tabla 2 . Glicoproteínas identificadas en CMVh (adaptado de [8,15])					
Gen	Función	Fenotipo	Gen	Función	Fenotipo
RL10	Glicoproteína	No esencial	UL73	Glicoproteína N	Esencial
TRL14	Desconocida	No esencial	UL74	Glicoproteína O	¿Esencial?
UL4	Glicoproteína	No esencial	UL75	Glicoproteína H	Esencial
UL5	Desconocida	No esencial	UL77	Clivaje/ Empaquetamiento del ADN	Esencial
UL11	Glicoproteína	No Esencial	UL93	Desconocida	Esencial
UL22A	¿Papel en las células dendríticas?	No Esencial	UL100	Glicoproteína M	Esencial
UL33	Receptor proteína G	No Esencial	UL115	Glicoproteína L	Esencial
UL38	Desconocida	Desconocida	UL119	Receptor Fc	No Esencial
UL41A	Desconocida	Desconocida	UL132	Desconocida	No Esencial
UL50	Salida	Esencial	US27	Receptor proteína G	No Esencial
UL55	Glicoproteína B	Esencial			

1.3 GENOMA Y VARIABILIDAD

1.3.1 Estructura del genoma

El genoma de CMVh tiene una organización de clase E. Este genoma existe como una mezcla equimolar de 4 isómeros genómicos generados mediante inversión de las regiones “unique long” (U_L) y “unique short” (U_S) ¹⁸. El genoma está organizado en estas 2 regiones únicas, cada una de las cuales está flanqueada en el extremo interno por una secuencia repetida interna (IR_L e IR_S) y en el extremo externo por una secuencia repetida terminal (TR_L y TR_S); por lo que, el genoma tendría una organización general como la que sigue: TR_L-U_L-IR_L-IR_S-U_S-TR_S. Las secuencias U_L y U_S comprendidas entre las secuencias repetitivas, contienen la práctica totalidad de los genes. Ambas secuencias repetitivas (TR_L y TR_S) tienen una región de unas pocas pares de bases denominada “secuencia a”, mientras que TR_L además contiene secuencia “b” y TR_S secuencia “c”. Las regiones IR_L-IR_S contienen secuencias b’ a’ c’, donde la prima significa orientación reversa; por lo que las repeticiones se organizan de la siguiente manera: a_nb-U_L-b’ a’_nc’-U_S-ca_n. Las secuencias

INTRODUCCIÓN

terminales a_n pueden también recombinarse con las secuencias internas a_n para dar lugar a la isomerización del genoma ¹⁹ (**Figura 3**).

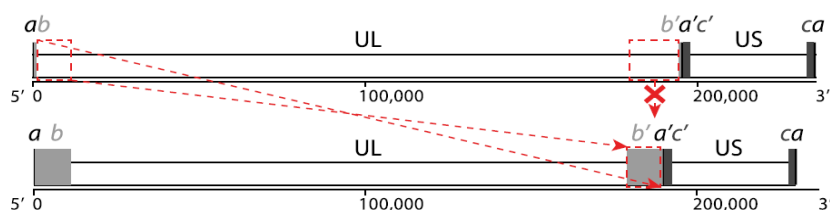


Figura 3. Esquema del genoma de CMVh de una cepa salvaje (arriba) y de una cepa de AD169 (abajo). Las regiones “unique long” y “unique short” son indicadas como UL y US. Las regiones repetidas son representadas como a , b y c , donde las primas designan orientación invertida. Las secuencias ab y $b'a'$ corresponden a las regiones repetidas largas terminales e internas (TRL/IRL); las secuencias $a'c'$ y ca corresponden a las regiones repetidas cortas terminales e internas (IRS/TRS). En rojo, se muestra la reorganización genómica que ocurre durante los múltiples pases de una cepa de laboratorio (delección del extremo UL 3' y reemplazamiento por una copia invertida del extremo UL 5') (adaptado de Sijmons et al [19]).

El análisis secuencial de genomas de CMV como el de chimpancé, el de la cepa de laboratorio AD169 o el de la cepa clínica Merlin ha permitido predecir la presencia de 164-192 genes de CMVh ^{5,20,21} (**Figura 4**). Sin embargo, un estudio posterior ha identificado 4 proteínas nuevas (RL8A, RL9A, UL150A y US33A) sugiriendo la posibilidad de que existan más Open Read Fragments (ORF) que codifican proteínas ²². Confirmando dicha hipótesis, un estudio posterior ha revelado la altísima complejidad de la expresión genética de CMVh cuando se identificaron 604 proteínas adicionales

INTRODUCCIÓN

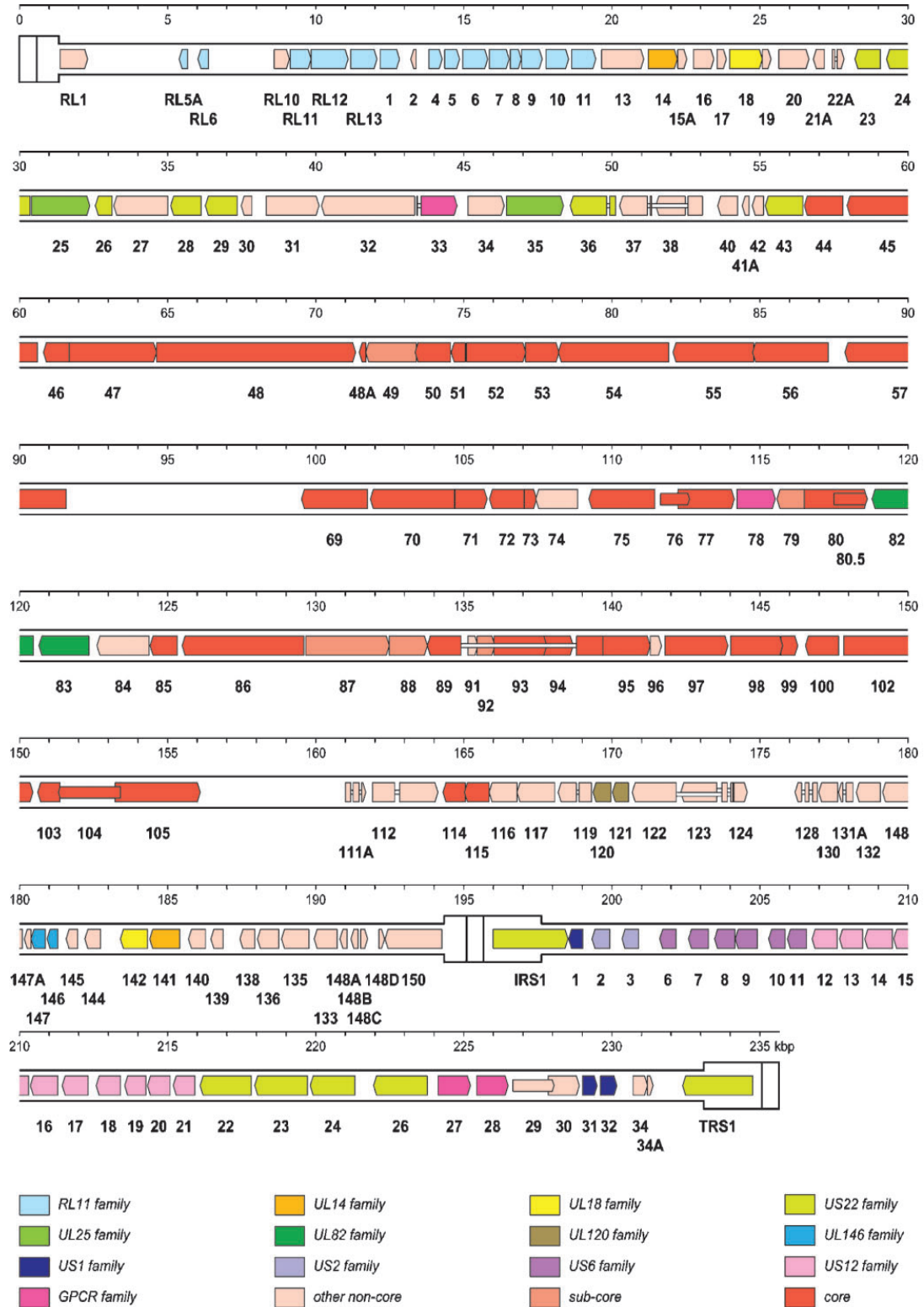


Figura 4. Contenido genético de la cepa salvaje de CMVh (adaptado de Dolan et al [5])

1.3.2 Variabilidad genética

A pesar de que todos los aislamientos naturales de CMVh muestran un elevado grado de homología entre sí, una característica de CMVh es su elevado polimorfismo o alta variabilidad genómica. Las cepas de laboratorio AD169 y Towne son cepas atenuadas en su virulencia debido al gran número de pases recibidos en cultivos celulares, por lo que usualmente contienen delecciones y/o mutaciones en diversos genes que pueden llevar a influir en el tropismo celular ²⁴. Cuando estas cepas son comparadas con aquellas que han recibido un número bajo de pases, se observan en su genoma una delección de aproximadamente 15 kb y 13 kb, que codifican 19-22 ORFs. Estos segmentos se encuentran situados en el extremo 3' de la región UL (algunas veces referida como UL/b) y son reemplazados por una copia invertida del extremo 5' de la región UL, dando lugar a un alargamiento de las repeticiones b. UL/b' también se ha identificado en una serie de aislamientos clínicos que han recibido un pequeño número de pases como la cepa Toledo, confirmando que es una marca universal de las cepas de CMVh y claramente contiene factores que son dispensables para la replicación en fibroblastos, pero sí esenciales para la virulencia o expresión *in vivo* contribuyendo así a la patogénesis de la infección por CMVh ^{20,24,25}. Además, AD169 presenta mutaciones en genes como RL5A, RL13 y UL131A ^{20,26,27} y se han encontrado en determinadas cepas mutaciones adicionales en UL42, UL43 o UL36 ²⁸⁻³⁰. Todo ello sugiere que incluso un pequeño número de pases en los fibroblastos humanos pueden dar lugar a mutaciones en el genoma viral. Una de las grandes diferencias entre los aislamientos clínicos y las cepas de laboratorio es su capacidad para infectar diferentes tipos de células. Los aislamientos clínicos pueden infectar

INTRODUCCIÓN

fibroblastos, células epiteliales y endoteliales, mientras que las cepas de laboratorio pierden la capacidad de infectar o replicarse en las células epiteliales y endoteliales. Este cambio en el tropismo parece estar asociado con la mutación en uno de los tres genes que conforman el locus UL128 ^{31,32}, aunque también se han descrito mutaciones en los genes RL5A, RL13 y UL9 (Familia RL11) tras la adaptación de los aislamientos clínicos a fibroblastos sugiriendo un posible papel en el tropismo de dichos genes ^{5,8}.

CMVh infecta a muchos tipos de células dando lugar a un rango diverso de manifestaciones clínicas sugiriendo que la evolución clínica puede estar relacionada con la variación genética entre las cepas y la respuesta inmune del hospedador ³³. Las técnicas diagnósticas utilizadas en la actualidad no nos permiten identificar que pacientes infectados desarrollarán secuelas; sin embargo, la evidencia disponible hasta la fecha sugiere que tanto los factores del hospedador y factores virales como la inmunidad maternal, la carga viral en el líquido amniótico o el tipo de cepa de CMVh, pueden contribuir a la evolución de la infección congénita ³⁴, siendo recientemente la carga viral propuesta como un buen marcador predictivo y pronóstico de la severidad de la enfermedad especialmente de la pérdida auditiva y las manifestaciones sistémicas ^{35,36}.

Como se ha mencionado anteriormente, aproximadamente 20 ORFs han demostrado exhibir variabilidad nucleotídica en diversos estudios estableciendo la existencia de diferentes grupos o genotipos (**Tabla 3**). Si esta variabilidad contribuye a la evolución de la infección por CMVh en general y a la infección congénita en particular, está actualmente en pleno debate, ya que algunos de los resultados inconsistentes encontrados son debidos a la heterogenicidad

INTRODUCCIÓN

demográfica de los sujetos, al sesgo geográfico, a la falta de un grupo control apropiado y el pequeño número de sujetos ³⁷. El conocimiento de si determinados genotipos guardan relación con las diferentes evoluciones de la enfermedad, permitiría disponer de una nueva herramienta diagnóstica para una mejor intervención médica.

Tabla 3. Variabilidad en los genes de CMVh			
Gen/región variable	Proteína	Número de Genotipos	Referencias
UL1*	Glicoproteína UL1	3	[38]
UL4*	Glicoproteína 48	4	[38]
UL6*	Glicoproteína UL6	4	[38]
UL7*	Glicoproteína UL7	3	[38]
UL10*	Glicoproteína UL10	3	[38]
UL11*	Glicoproteína UL11	3	[20]
UL37	Glicoproteína UL37	5	[39]
UL55	Glicoproteína B	gB1-gB4 y 3 gB 5-7	[40,41]
UL73	Glicoproteína N	gN1-gN4c (7 subtipos)	[42,43]
UL74	Glicoproteína O	gO1-gO5 (7 subtipos)	[42,44]
UL75	Glicoproteína H	gH1-gH2	[45]
UL123	IE1	3	[46,47]
UL139	Glicoproteína UL139	3 (5 subtipos)	[48]
UL144	UL144 (Receptor TNF- α)	A,B,C (subtipos AC y AB) o 1-3	[49-52]
UL146	vCXCL-1	14 (G1-G14)	[53-55]
UL147	vCXCL-2		[53-55]
STR**	No disponible	24 STRs, 1-15	[52,56,57]
Secuencia a	No disponible	6	[50]
* UL1, UL4, UL6, UL7, UL10 y UL11 pertenecen a la familia RL11.			
** Short tandem repeats			

A continuación, se describen con mayor profundidad los genes estudiados en esta tesis: UL55, UL75 y UL144.

1.3.2.1 Glicoproteína B (gB)

La glicoproteína B (codificada por el gen UL55), la principal glicoproteína de la envoltura (aunque un estudio reciente ha demostrado que la glicoproteína gM representa el 10% del contenido proteico del virión vs 1% en gB) ¹⁵, es un importante factor para la replicación *in vitro* e *in vivo*, así como también para la entrada a la célula del hospedador, transmisión del virus de célula a célula y fusión (*cis* o *trans*) de las células infectadas junto con gH/gL ¹⁶. La

INTRODUCCIÓN

glicoproteína gB actúa regulando a la baja la adsorción inicial a los glicosaminoglicanos heparánulfato (junto con gM/gN), e interacciona con receptores celulares tales como los receptores de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) ⁵⁸, α - receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α) ⁵⁹ e integrinas ⁶⁰. Hasta la fecha su estructura es poco conocida, siendo el componente más conservado de la envoltura. Es estructuralmente similar a las gB de virus *Herpes simplex* y virus *Epstein-Barr*, a la proteína G del virus estomatitis vesicular, y a la gp64 de *Baculovirus*, las cuales forman parte de una nueva clase de proteínas de fusión viral denominadas de clase III, que difieren de las de clase I (Hemaglutinina *Influenza*), y clase II (proteína E de *Flavivirus*) ⁶¹.

Es una glicoproteína de membrana tipo I (160/58 kD) compuesta de una subunidad transmembrana (TM), gp55, y una subunidad de superficie, gp116, codificada por el gen UL55 (~3.9 kb) unidas por puentes disulfuro ⁶². Se trata de un polipéptido de 906 aminoácidos (aa´) que está constituido por 18 sitios N-glicosilación y 5 regiones localizadas entre (**Figura 5**) ⁶³:

1. Aminoácidos 1 y 26: enclave de la secuencia señal en el extremo amino terminal.
2. Aminoácidos 26 y 707: enclave del ectodominio que contiene un sitio de clivaje de furina, RTRR, en los residuos 456-459.
3. Aminoácidos 707 y 750: región membrana proximal.
4. Aminoácidos 750 y 772: región transmembrana.
5. Aminoácidos 773 y 906: dominio citoplasmático terminando en el extremo C-terminal.

INTRODUCCIÓN

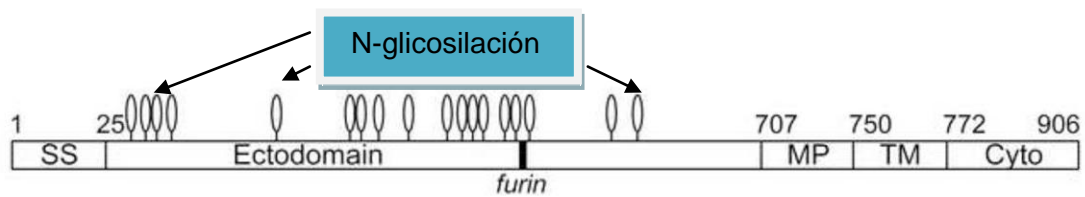


Figura 5. Esquema de la glicoproteína gB de CMVh: SS – secuencia señal, MP – región membrana proximal, TM – región transmembrana, Cyto – dominio citoplasmático (adaptado de Sharma et al [63])

Se considera que es un trímero cuyo ectodominio comparte un 24% y 30.3% de homología con los ectodominios de virus Herpes Simplex tipo 1 y virus *Epstein-Barr*, el cual forma agregados en forma de roseta, gracias a la presencia de una serie de bucles (loops) de fusión, que suelen ser ricos en residuos hidrofóbicos y aromáticos, y cuya inserción perturba la capa externa de las membranas de las células diana, facilitando así la fusión. Se han propuesto 2 bucles de fusión internos y 4 residuos hidrofóbicos: Y155, I156, Y157 y W240 (**Figura 6**)⁶³.

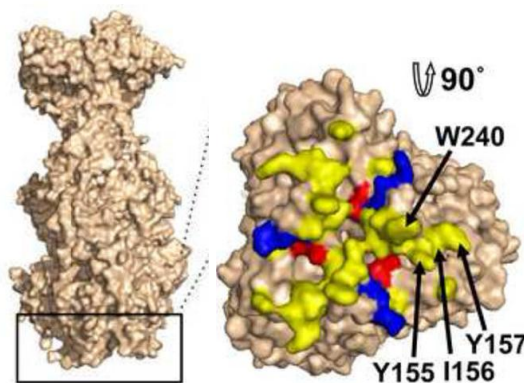


Figura 6. Glicoproteína B en forma de roseta: residuos hidrofóbicos (amarillo), residuos cargados positivamente (azul), residuos cargados negativamente (rojo) (adaptado de Sharma et al [63])

La variabilidad en gB fue por primera vez descrita en cepas de laboratorio (AD169 y Towne) y clínicas mediante digestión por enzimas de restricción entre los codones 384-717 (alrededor del sitio de clivaje de gB)⁴⁰. La variación génica se concentra en uno o varios cambios aminoácídicos en 35

INTRODUCCIÓN

codones, siendo el sitio de clivaje gp55 (codones 448-480) donde se localizan la mayor variabilidad con 23 posiciones variables ^{40,64}. Se han identificado cuatro genotipos principales (gB1, gB2, gB3, gB4) y tres genotipos adicionales (gB5, gB6, gB7) ^{40,41} pero en muy baja frecuencia, pudiendo ser actualmente considerados como subtipos de gB1 y gB3 ⁶⁵. Parece ser que existe un alto grado de homología (~98-99%) entre las cepas clínicas de un mismo genotipo, mientras que esta homología es menor entre los diferentes genotipos (88-95%). El genotipo gB3 es el más divergente (88-90% de homología), mientras que el genotipo gB1 presenta un 95% de homología con gB2 y gB4. Las cepas de laboratorio Towne y AD169 son clasificadas dentro de los genotipos gB1 y gB2. Además, se han reportado diferencias en la distribución geográfica de los genotipos ⁶⁶ y en el tropismo celular (gB1 no infectaba linfocitos T mientras que gB2 y gB3 si). Se han descrito infecciones mixtas ^{67,68} y se ha demostrado que el 49% de las infecciones por CMVh causados por genotipos mixtos presentan mayores cargas virales ⁶⁸.

Debido a que gB es el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes y a que es esencial para algunas funciones tales como la unión a receptores y fusión celular, algunos autores indican que dichas variaciones tienen una función importante en el desarrollo de la enfermedad, debido a que modifican el tropismo del virus hacia diferentes tejidos; sugiriendo la relación entre los genotipos de gB y la evolución clínica en diferentes tipos de pacientes como en trasplantados de médula ósea, trasplante de órgano sólido, VIH, y en infección congénita. Un ejemplo de ello, son diferentes estudios que incluyen pacientes adultos que reciben precursores hematopoyéticos, los cuales tienen mayor probabilidad de presentar enfermedad por CMVh cuando son infectados por

INTRODUCCIÓN

cepas genotipo gB3, e incluso de tener mayor dificultad de erradicar el virus y mayor riesgo de reactivación/ reinfección ^{69,70}. En el caso de receptores de trasplante, se ha descrito gB1 como el genotipo más frecuente y gB4 como el más infrecuente ^{71,72}. Se ha sugerido que la distribución de los genotipos de gB entre los niños jóvenes es la imagen especular de las cepas presentes en receptores de trasplante de órganos ⁷³. Algunos estudios han demostrado que los diferentes genotipos de gB están asociados con la evolución clínica en la infección congénita, pudiendo causarla todos ellos aunque ninguno parece estar asociado con transmisión intrauterina. El genotipo gB1 ha sido descrito como el más prevalente en niños ^{50,65,74-76}, asociado a hepatomegalia ^{74,77}, mientras que otros describen gB3 como el genotipo más prevalente asociado a hepatoesplenomegalia ⁷⁸. El genotipo gB2 se ha asociado con secuelas a largo plazo ⁷⁸ con el genotipo que preferiblemente se transmite de madre a hijo en las infecciones mixtas ^{79,80}, y en algún estudio ha sido descrito como el más prevalente ^{80,81}. Sin embargo, otros investigadores no han establecido una relación directa entre la evolución de la enfermedad y el genotipo de la glicoproteína B, a pesar de que hayan identificado un genotipo que prevaleciera sobre los demás ^{37,50,51,81,82}.

1.3.2.2 Glicoproteína H (gH)

Es una glicoproteína de membrana de tipo I de 86 kDa, producto del gen UL75, el cual es transcrito a un ARNm de ~ 2.9 kb (cepa Towne). Se ha descrito que este gen está compuesto de 2.229 (AD169) y 2.226 (Towne) nucleótidos (nt), y es traducido a un polipéptido de 743 (AD169) y 742 (Towne) aa (delección en 36 aa) dependiendo de la cepa de laboratorio estudiada. Presenta 6 sitios N-glicosilación y una cola citoplasmática extremadamente

INTRODUCCIÓN

corta de 6 aa'. Es después de la gB, la segunda glicoproteína más conservada de la familia *Herpesviridae* y es menos abundante que gB. Como se ha comentado anteriormente, la gH es esencial en el ciclo de infección de CMVh, pues participa con la gB en la entrada y en la transmisión "célula a célula", y en particular en la fusión de la envoltura del virión y la membrana plasmática. Además, es capaz de generar potentes anticuerpos neutralizantes y respuesta inmune celular mediante Linfocitos T CD4+ (no encontrado con Linfocitos TCD8+), sugiriendo un papel importante en el aclaramiento del virus y de las células infectadas por el mismo.

Por otro lado, cabe señalar que en los herpesvirus humanos, el complejo gH/gL es en realidad un complejo heterotrimérico que incorpora una tercera glicoproteína de membrana gO, diferencias que sugieren que la gH de cada especie de *Herpesvirus* participa en un mecanismo distinto de fusión de membranas y entrada del virus. Estos mecanismos, y por consiguiente, el complejo gH/gL dimérico o trimérico unido covalentemente mediante puentes disulfuro⁸³, guardarían relación con el tropismo celular de CMVh *in vivo*⁸⁴. Por tanto, el complejo trimérico gH/gL/gO media en la entrada en fibroblastos (**Figura 6**). De hecho, la gO actúa como una chaperona promoviendo el transporte intracelular de gH/gL desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi, facilitando así la incorporación de gH/gL dentro de la envoltura lipídica, pero dicha glicoproteína permanece en el retículo endoplásmico o *cis-golgi* previa disociación de esta antes de la formación del virus⁸⁵. Gracias al estudio de cepas de laboratorio como AD169, se han observado mutantes de gO que producen pequeñas placas de crecimiento en fibroblastos; sugiriendo la menor producción de gH/gL en las partículas virales, y como consecuencia, problemas

INTRODUCCIÓN

para entrar en los fibroblastos así como en las células endoteliales y epiteliales⁸⁶. Recientemente, se ha descrito que gH forma parte del complejo pentamérico constituido por gH, gL (UL115), y UL128-UL130-UL131 (**Figura 7**). El reconocimiento de la existencia de este complejo empezó con las observaciones de las cepas de laboratorio AD169 y Towne, las cuales recibieron múltiples pases en fibroblastos y muchos menos pases en el caso de células endoteliales, epiteliales y monocitos-macrófagos. Gracias a la secuenciación de estas cepas, se observó que existían mutaciones en un bloque de 22 genes entre UL128 y UL131. La reparación de dichos genes fue suficiente para restablecer la infección de células endoteliales y epiteliales^{31,87}, por lo que esto apoya la idea de que gH/gL/UL128-131 media la entrada de CMVh en las células endoteliales, epiteliales, monocitos y macrófagos, la cual es llevada a cabo mediante macropinocitosis o endocitosis y fusión pH bajo dependiente con endosomas.

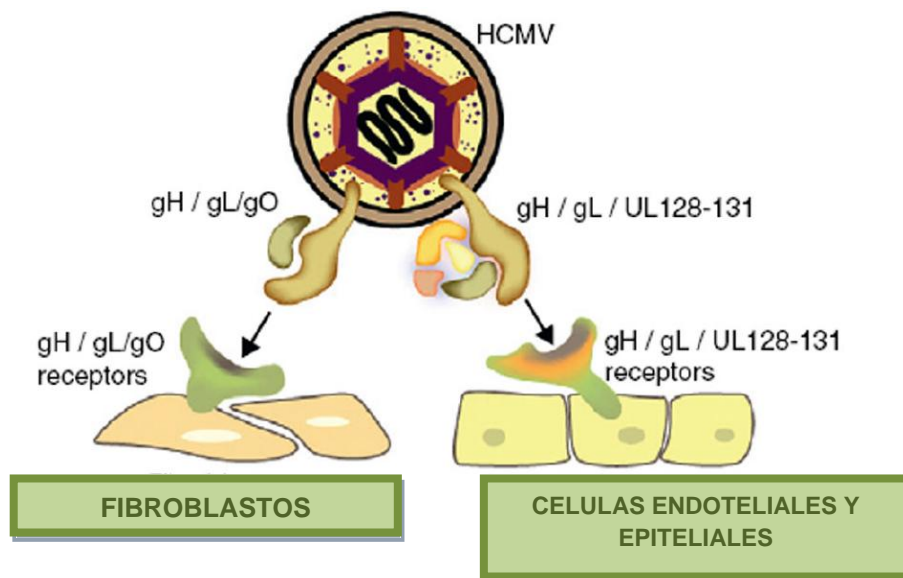


Figura 7. Receptores de la entrada viral de CMVh atendiendo a los diferentes tipos de células (adaptado de Vanarsdall et al [16])

INTRODUCCIÓN

El análisis secuencial de este ORF UL75 sugiere un gen altamente conservado con aproximadamente el 96.5% de conservación a nivel de aa', pero parece que dicha variabilidad se encuentra principalmente entre los primeros 37 aa' incluyendo la secuencia péptido señal ⁶², describiéndose 2 genotipos (gH1 y gH2) en función de la variabilidad en el sitio de clivaje del extremo N-terminal ⁸⁸. Diferentes genotipos de gH han sido asociados con la severidad de la enfermedad ^{72,89-91}. Ishibasi y colaboradores analizaron los anticuerpos frente a la gH de 84 receptores y donantes de trasplante renal seropositivos para CMVh. De estos 84 pacientes, 45 tenían anticuerpos dirigidos contra el mismo epítipo de gH, y 32 con epítipos diferentes. Cuando se realizó un trasplante con genotipos discordantes de CMVh, la frecuencia de enfermedad por CMVh fue significativamente mayor (28% *versus* 9%), y el nivel de antigenemia significativamente más alto ⁹¹. En el caso de la infección congénita, algunos autores han publicado no existir una distribución diferente de los genotipos entre los niños con infección congénita y adquirida, pero sí que la infección por el genotipo gH2 disminuía el riesgo de pérdida auditiva en niños, asociando la pérdida auditiva neurosensorial con genotipo gH1 y mayor carga viral en orina. Sin embargo, no encontraron que el genotipo gH predijera las secuelas en los recién nacidos tras una infección congénita ⁹², como ocurre en algún otro artículo ⁸², donde además demuestran que la infección mixta es algo común en los niños con infección congénita, pero que ni está asociado a infección sintomática, ni a pérdida auditiva neurosensorial.

1.3.2.3 UL144

UL144 es una región que codifica un homólogo del mediador de la entrada en la célula del virus herpes simple (HVEM o HveA "herpes simplex virus entry mediator") que pertenece a la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF) ^{51,93}. Presenta una variabilidad en el 33% de sus aminoácidos entre diferentes aislamientos clínicos ⁴¹. Se han descrito 3 genotipos diferentes de UL144, denominados A, B y C, y genotipos recombinantes A/B y A/C basados en el polimorfismo de su ectodominio, siendo B el más común, y los recombinantes más infrecuentes, siendo estos últimos detectados más frecuentemente en recién nacidos con enfermedad por CMV congénito que en recién nacidos asintomáticos ⁴⁹. El genotipo UL144 B ha sido identificado como el genotipo más común en los recién nacidos, y ha sido asociado con cargas virales superiores a las presentes en los niños asintomáticos ³⁴. Sin embargo, el genotipo UL144 C se ha asociado con la interrupción del embarazo y con enfermedad sintomática cuando se realizaba el diagnóstico prenatal en el líquido amniótico de mujeres embarazadas. En contraposición, otros autores no han encontrado asociación entre el genotipo de UL144 y enfermedad ^{50,52,81,82} como en el caso los aislamientos de CMVh de receptores de trasplantes o adultos con SIDA, los cuales han mostrado variabilidad en esta región, pero no se ha observado que existiera una clara asociación entre las características clínicas y demográficas y el genotipo, lo que les ha llevado a sugerir que las combinaciones de los polimorfismos de los diferentes genes podrían conferir variaciones en la patogenicidad ⁵¹. Aunque hasta la fecha es desconocido si la variabilidad genética observada entre tales

cepas, reflejan adecuadamente la variabilidad de las cepas circulantes entre las personas inmunocompetentes en la población general.

1.3.2.4 OTROS

A parte del estudio de los genes previamente descritos se han estudiado otros, como gN, UL146, UL147, UL148, UL149, así como US28 y proteínas inmediatamente tempranas (IE1 e IE2).

UL73 es un gen altamente polimórfico ⁴¹ que codifica para la glicoproteína N, un componente gC-II implicado en la adhesión del virus a la célula hospedadora. Presenta una región polimórfica con 8 genotipos distintos: gN1, gN2, gN3a, gN3b, gN4a, gN4b, gN4c y gN4d. Se ha sugerido que los genotipos gN pueden actuar como marcadores de virulencia y factor discriminatorio en la selección de recién nacidos infectados por CMVh con riesgo de desarrollar secuelas ^{94,95}. Parece que pudiera estar correlacionado con la evolución clínica crónica, pero no con las manifestaciones clínicas agudas de los casos de infección congénita ^{42,43}. Sin embargo, en diferentes estudios que incluyen niños con infección congénita, receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos o TOS, a pesar de que gN3a fue el más prevalente, no hubo una correlación del genotipo con las características clínicas de los pacientes ^{70,82,96}.

UL146 y UL147 son genes no esenciales para la replicación *in vitro*, pero se ha sugerido que pueden tener algún papel en la infectividad *in vivo* ⁵⁴. UL146 codifica vCXC-1, una quimiocina similar a interleuquina-8, que es secretada durante la infección, e induce la movilización de calcio, la quimiotaxis y la desgranulación de neutrófilos. Es uno de los genes más variables del genoma

INTRODUCCIÓN

de CMVh describiéndose hasta 15 genotipos diferentes ^{97,98}. Debido a ello, se ha sugerido una correlación con la evolución a largo plazo en infección congénita, o durante la reactivación en pacientes inmunocomprometidos ^{54,97,98}, aunque no ha podido establecerse que UL146 o UL147 puedan actuar como marcadores predictivos de las secuelas clínicas.

En el caso de UL149 se ha observado que secuencias amnioacídicas concretas están asociadas con microcefalia y enfermedad de Hirschsprung ⁹⁹; sin embargo, este estudio no encontró ninguna correlación entre la variabilidad génica y la evolución clínica.

US28 codifica un receptor homólogo a los receptores de β -quimiocinas, siendo reconocido como un importante factor de virulencia en la enfermedad vascular asociada a CMVh y en modelos de glioblastoma asociados al virus. Se han descrito 4 genotipos principales (A,B,C,D); dentro de A y B existen 3 (A1,A2,A3), y 2 (B1,B2) subgrupos minoritarios, todos ellos en función de las 6 sustituciones aminoacídicas localizadas en el extremo N-terminal compuesto por 300nt. Al igual que con los otros genes estudiados, algunos autores han demostrado asociación ¹⁰⁰ o no del genotipo con la severidad de la enfermedad ^{49,82}. US28A fue el genotipo más común en Estados Unidos ⁴⁹. Además recientemente se ha descrito un nuevo genotipo al que han denominado E ⁸².

Las proteínas inmediatamente tempranas (IE1 e IE2) tienen importantes funciones en la regulación de la replicación viral y en la modulación del ciclo celular, protegiendo a las células de la apoptosis a través de la activación de PI3K, y de la kinasa celular Akt ¹⁰¹. Se han descrito 4 genotipos de IE1 basándose en el polimorfismo encontrado en el exón 4 de este gen, el cual

parece no estar asociado con una peor evolución, o con algún efecto sobre los parámetros cinéticos virales *in vivo*⁹⁶.

1.4 MECANISMO DE REPLICACIÓN y PATOGÉNESIS

1.4.1. Ciclo de replicación

Es importante conocer los mecanismos básicos de replicación de CMVh para comprender la patogenia y el tratamiento de las infecciones producidas por este virus. El esquema general de la replicación del CMVh es parecido al de los restantes *Herpesvirus*, pero su ciclo replicativo es algo más largo, y por tanto, lento, lo que conlleva que el efecto citopático del CMVh en cultivos celulares tarde en aparecer entre 1 y 2 semanas.

CMVh se une a los receptores celulares (receptores heparánulfato, receptor de factor de crecimiento epidérmico, integrina $\alpha\beta 3$, receptor α -factor crecimiento derivado de plaquetas, receptores toll-like tipo 2), y penetra en la célula mediante fusión de las glicoproteínas de la envoltura viral con la membrana citoplasmática seguida de la liberación de la cápside y proteínas del tegumento al citoplasma celular (**Figura 8, paso A**). Tras la penetración, las proteínas del tegumento unidas a la cápside viral son transportadas hacia el núcleo de la célula infectada a lo largo de los microtúbulos, y el ADN viral penetra en el interior del núcleo a través de los poros existentes en la membrana nuclear. Al entrar en el núcleo, el ADN viral pierde su morfología lineal, se circulariza y se transcribe en múltiples mensajeros (ARNm). Una vez que el genoma entra en el núcleo, comienza la síntesis de las proteínas virales con actividad reguladora implicando la expresión de tres tipos de genes

INTRODUCCIÓN

denominados α , β y γ , que se expresan secuencialmente, originando proteínas inmediatas-tempranas (Immediate-early), tempranas (early) y tardías (late) (**Figura 8, paso B**). Los primeros en ser transcritos son los inmediatamente tempranos, que se traducirán en proteínas α , las cuales son funcionalmente reguladoras, acumulándose en el retículo endoplásmico del citoplasma celular donde se fosforilan, para luego acumularse en el núcleo. Durante la fase siguiente, tiene lugar la replicación de los genes tempranos, cuyo resultado es la producción de proteínas que regulan la síntesis del ADN viral, como la ADN polimerasa. Aunque la transcripción de los genes γ comienza en etapas tempranas del ciclo replicativo, la síntesis de proteínas γ no ocurre hasta que ha terminado la replicación del ADN viral. Estas proteínas son fundamentalmente estructurales, las más numerosas y abundantes como las de la cápside o tegumento. Tras la expresión de los genes tardíos, se inicia el ensamblaje de las cápsides en el núcleo, y junto con la envoltura, pasan a través de las membranas del núcleo de la célula infectada saliendo al citoplasma. Las partículas asociadas al tegumento son transportadas hasta el complejo de ensamblaje (AC), que contiene los componentes del retículo endoplásmico, aparato de Golgi y maquinaria endosomal, donde las partículas virales adquieren la envoltura (**Figura 8, paso C**). Las partículas virales infecciosas maduras y los cuerpos densos son transportados a la superficie celular produciéndose la liberación de las partículas virales al exterior (**Figura 8, paso D**).

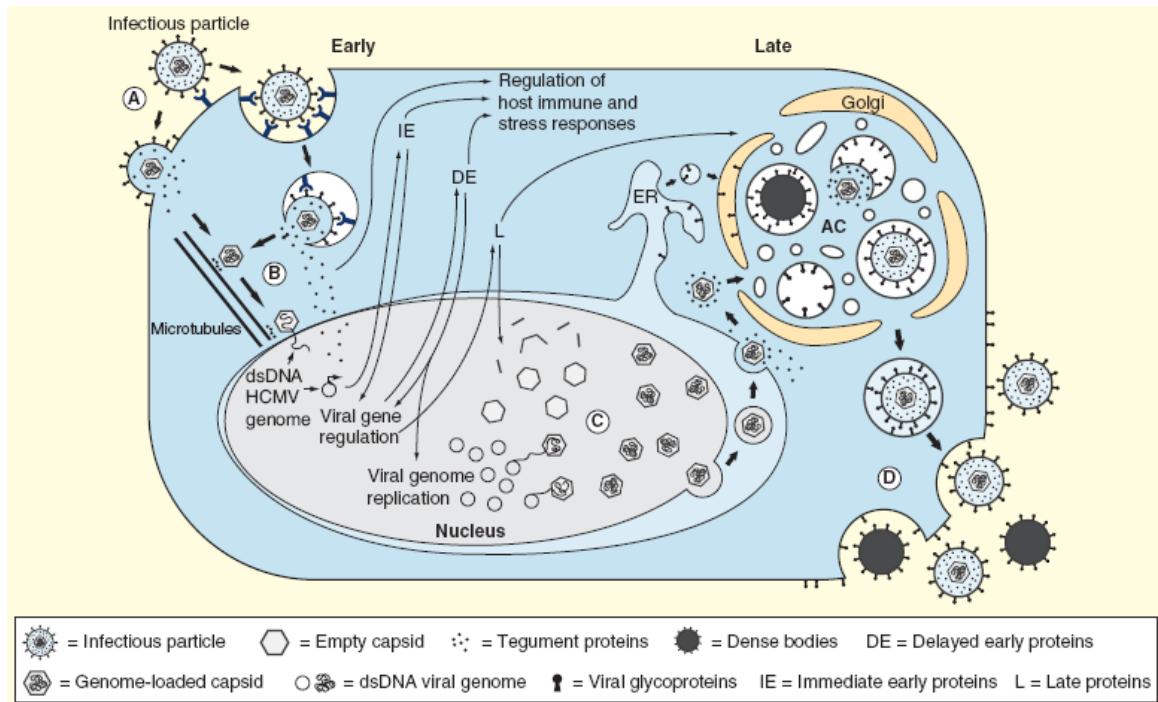


Figura 8. Ilustración del ciclo de replicación de CMVh (adaptado de Jean Beltran et al [102])

1.4.2 Latencia

CMVh es capaz de establecer latencia en lugares específicos tras una infección lítica primaria evitando el reconocimiento, debido al alto número de genes que actúan de barrera frente a muchos mecanismos de defensa ^{103,104}. El ADN viral ha sido detectado en monocitos CD14+, células dendríticas, megacariocitos, células progenitoras mieloides en médula ósea, células epiteliales de tejido glandular y de mucosas, células musculares, fibroblastos, hepatocitos y células endoteliales vasculares ^{105,106}. Sin embargo, hasta la fecha, no ha sido detectado en células B, células T o leucocitos polimorfonucleares.

1.4.3 Respuesta inmune

Como se ha mencionado anteriormente, las glicoproteínas gB o gH son la diana de anticuerpos antineutralizantes, jugando un papel en la prevención de la extensión sanguínea del virus. Esta respuesta humoral no es del todo conocida. Sin embargo, la importancia de esta respuesta podría ser soportada por la evidencia de que la infección primaria es más frecuente y severa en pacientes seronegativos que en los receptores de trasplantes seropositivos ⁶. Las células Natural Killer parece que también juegan un papel en el aclaramiento viral ¹⁰⁷, al igual que la inmunidad adaptativa a través de células T CD4+ y CD8+ en el control de la replicación viral y la enfermedad ^{108,109}. Se ha descrito respuesta celular T CD4+ frente a gB, gH, pp65, p72, p86 y UL69 ^{110,111}. Se piensa que la respuesta celular T CD8+ y humoral son insuficientes para el control de la infección, y que se requiere la respuesta celular T CD4+, quizás para ayudar a mantener la respuesta celular T CD8+. Esta última respuesta frente a pp65 o p72 parecía representar la mayoría de la respuesta celular T, sin embargo sólo representa el 40% ¹¹², y el 60% restante correspondería a la respuesta frente a gB, pp50, p86, pp28, pp150, pp71 y un número de proteínas codificadas en U_S ¹¹³. También, CMVh implica a numerosos mecanismos para controlar la respuesta inmune del hospedador, incluyendo la regulación a la baja de las moléculas del complejo de histocompatibilidad I y II, la expresión de homólogos de complejo de histocompatibilidad I, homólogos de interleuquina 10, interleuquina 8, o de receptores de quimioquinas ⁶.

1.5 EPIDEMIOLOGÍA

La infección por CMVh es común a través del mundo y exhibe una variabilidad geográfica significativa. Parece ser endémica en la infancia en determinados países, con seroprevalencias que van desde el 45 al 100% en mujeres en edad reproductiva. Esta seroprevalencia suele ser más alta en países subdesarrollados (Sudamérica, África y Asia), en los que se estima que el 90% de la población está infectada, frente al 60% en países desarrollados ¹¹⁴. Sin embargo, es elevada en algunas partes de Europa (Italia y Suecia) y Medio Este (Turquía e Israel), siendo menor en el Este de Europa y Estados Unidos ¹¹⁵.

En nuestro país, la seropositividad ha disminuido en los últimos años, siendo la tasa global actual del 57% ¹¹⁶. En general, la seroprevalencia aumenta con la edad ($\geq 60\%$ en personas mayores de 50 años) ¹¹⁷, con la raza no blanca (20-30% más de seroprevalencia) ¹¹⁸, y con el bajo estatus socioeconómico.

En adultos inmunocompetentes, la excreción viral es intermitente, mientras que en inmunodeprimidos e infección congénita, perinatal, o postnatal temprana es constante y prolongada ¹¹⁹. Las fuentes de infección incluyen orina, sangre, secreciones vaginales, secreciones cervicales, semen, leche materna, heces, y lágrimas. La transmisión del virus puede ser horizontal (mediante partículas infecciosas en excreciones e iatrogénicamente, mediante contacto directo, exposición ocupacional, transfusión sanguínea, o trasplante de órganos o células) o vertical (de madre a niño vía placentaria).

INTRODUCCIÓN

1.5.1 Infección congénita:

La infección por CMVh es la infección congénita más frecuente en países desarrollados, y resulta de la transmisión transplacentaria del virus al feto ¹²⁰. Por lo general, se han establecido valores de prevalencia del 0.3% al 2.3%; pero diversas series han mostrado rangos que oscilan entre el 0% al 13.6% ¹²¹. La incidencia de infección congénita por CMVh es población dependiente, paralela a la seroprevalencia maternal, a la edad maternal y a la edad gestacional (**Tabla 4**). Menos del 50% de las mujeres en edad reproductiva son seronegativas en países industrializados ¹¹⁵. Cada año, en esta población, la infección por CMVh ocurre en aproximadamente el 1-7%, y normalmente es asociada al contacto frecuente y prolongado con niños menores de tres años ¹²². Sin embargo, en países en vías de desarrollo o bien con bajo nivel socioeconómico, existen muy pocas mujeres adultas seronegativas ^{123,124}.

Tabla 4. Prevalencia de infección por CMVh en mujeres con edad reproductiva (adaptada de [125])

Localización	Población	N	Prevalencia (%)
Ankara (Turquía)	Mujeres 15-49 años	745	99
Cotonou, Benin	Mujeres embarazadas	211	97
Seúl, Corea del Sur	Clínica prenatal	575	96
Sendai, Japón	Clínica prenatal	10.218	95
Sao Paulo, Brasil	Mujeres embarazadas		
	Nivel medio	427	67
	Nivel bajo	179	84
Noreste de Italia	Mujeres embarazadas o hospitalizadas	12.568	77
Helsinki, Finlandia	Clínicas prenatales	1.088	71
Birmingham, EE.UU	Clínica prenatal		
	Nivel medio	12.140	54
	Nivel bajo	4.078	77
Grenoble, Francia	Clínica prenatal	1.018	52

INTRODUCCIÓN

Principalmente, la transmisión de madre a hijo es el resultado de una infección primaria, que conlleva un riesgo de transmisión del 30 al 35% y da lugar a una infección intrauterina más severa ¹²⁶. Si esta ocurre en el período preconcepcional (3 meses antes del último período menstrual), el riesgo de transmisión intratuterina es bajo (9.1%), mientras que si es en la época periconcepcional (4 semanas antes del último período menstrual), el virus es transmitido en el 30.8% de los casos¹²⁷. La infección congénita por CMVh puede resultar también de una infección recurrente (reinfección con una cepa diferente o reactivación del virus latente), sobre todo en poblaciones con altas tasas de seroprevalencia ¹²⁸, con un riesgo estimado de transmisión que oscila entre el 1.1 y el 1.7% en niños con madres portadoras de anticuerpos frente a CMVh antes del embarazo ¹²¹. La presencia de infección sintomática en recién nacidos de madres inmunes se ha relacionado con la reinfección por una cepa diferente de CMVh, debido a la adquisición de nuevas especificidades de los anticuerpos contra epítomos de la glicoproteína H de la nueva cepa de CMVh¹²⁹.

La tasa de transmisión de infección es más baja en el primer trimestre (36%) que en el tercer trimestre (77.6%), pero la severidad está relacionada con la época gestacional en la que la transmisión vertical ocurre, siendo más severa en los dos primeros meses de embarazo ¹³⁰. Aproximadamente el 10-15% de los niños infectados por CMVh presentan síntomas al nacimiento ³³, estimándose una tasa de mortalidad perinatal de alrededor 4-10% ^{126,131} y mayor riesgo de presentar afectación del sistema nervioso central y secuelas a largo plazo, tales como la sordera neurosensorial (35%) ³³, déficit cognitivo y motores (< 60%) ³³, convulsiones y déficit visuales (22-58%) ^{35,132,133}. Cada

INTRODUCCIÓN

año, se estima que en Estados Unidos 30.000 niños nacen con infección congénita por CMVh, estimándose 300 muertes y 6000 niños con problemas en habilidades tales como la pérdida de visión, sordera o retraso mental ¹³⁴. En España, con más de 490.000 nacimientos anuales, y con una prevalencia global estimada del 0.5%, el CMVh afectaría a 2.450 recién nacidos cada año, de los que 245 presentarían síntomas al nacimiento, 10 fallecerían y 410 presentarían secuelas a largo plazo (123 en niños sintomáticos y 287 en asintomáticos) ¹³⁵. En el caso de los niños asintomáticos, la sordera aparece en el 7-10%^{33,126}, mientras que el riesgo de déficit cognitivo y visual no ha sido estudiado sistemáticamente ^{126,133}. En general, la sordera es la complicación más habitual, siendo la infección congénita por CMVh, la principal causa no genética de sordera en niños con más de la mitad de los bebés nacidos con infección asintomática, y el 10% de recién nacidos asintomáticos, siendo progresiva en el 50% de los casos, apareciendo en meses e incluso años ¹³⁶.

No se puede finalizar este apartado sin hacer referencia a que diversos estudios en Europa y América muestran mayor riesgo de infección congénita en neonatos nacidos de madres con VIH (10.3% vs 2.2%), mayor riesgo de infección congénita sintomática (23% vs 6.7%), e incluso mayor tasa de mortalidad y progresión acelerada de la enfermedad del sistema nervioso central, especialmente en el retraso en el desarrollo y empeoramiento motor ^{126,137,138}.

1.5.2 Infección perinatal

La transmisión ocurre fundamentalmente por contacto con las secreciones cervicales de la madre durante el parto o a través de la lactancia materna. La prevalencia de infección por CMVh en recién nacidos prematuros, oscila entre el 12-22%, dependiendo de la edad gestacional, la proporción de niños alimentados con leche materna y el porcentaje de madres seropositivas en la población ¹³⁹. La infección perinatal no suele tener repercusión clínica debido principalmente a que suelen ser el resultado de las reactivaciones del virus en la madre, por lo que estos niños nacen con inmunidad protectora adquirida de forma transplacentaria. Por el contrario, los recién nacidos prematuros de muy bajo peso tienen un sistema inmunitario inmaduro y carentes de las inmunoglobulinas IgG protectoras maternas (aparecen a las 28 semanas de gestación), por lo que son susceptibles de una infección postnatal fundamentalmente a través de la leche materna. La inmunidad maternal no previene la virolactia ni previene la transmisión de CMVh mediante la leche materna ¹²⁵.

La leche materna es la principal fuente de CMVh frente a las secreciones cervicales, presentando tasas de transmisión del 5 al 50%; además, no se ha demostrado transmisión en niños de madres infectadas con leche de fórmula, lo que sugiere que es una fuente de transmisión por sí sola ¹⁴⁰. El mecanismo de excreción de CMVh en la leche es desconocido, detectándose solo en la leche (> 95% de mujeres seropositivas) y no en orina ni en saliva. La reactivación tendrá lugar en la glándula mamaria (96% de las madres seropositivas), donde el ADN del virus será detectable en el calostro en muy pequeña cantidad, alcanzando el pico entre las 4-8 semanas desapareciendo

INTRODUCCIÓN

entre las 9-12 semanas postparto ¹³⁹, y ocurriendo la transmisión viral en el 37% de los niños ^{141,142}. Entre los factores de riesgo para la transmisión parecen encontrarse: a) la aparición precoz del virus en la leche, b) la presencia de una carga viral elevada y c) la excreción viral prolongada en la leche. El impacto epidemiológico de la leche materna es amplificado por el hecho de que los niños que adquieren CMVh en el primer año de vida excretarán virus en saliva y orina durante años, y ellos tendrán la misma oportunidad de transmitir CMVh a sus cuidadores y a otros niños.

1.5.3 Transmisión por contacto directo

La transmisión por contacto directo es posible a través de las secreciones^{143,144}, del personal sanitario (tasas de seropositividad no más elevadas que el resto de población)¹⁴⁵, o de objetos contaminados. Existe evidencia de que CMVh puede sobrevivir en saliva o en superficies durante períodos variables. De hecho, se ha recuperado CMVh de saliva en juguetes de guarderías, por lo que se postula que la saliva puede ser una vía de transmisión en niños ¹⁴⁶. En un estudio en el que se aplicó saliva que contenía CMVh a diferentes superficies, se evaluaron las muestras por cultivo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ¹⁴⁷. La presencia de CMVh era viable en metal y madera una hora, en plástico y cristal tres horas, y en ropa y basura 6 horas. Las superficies secas tenían menos probabilidades de tener virus viable que en las superficies húmedas. De modo, que una correcta higiene de manos hace que la transmisión sea muy poco frecuente¹⁴⁸.

INTRODUCCIÓN

1.5.4 Transmisión por trasplante de órganos (TOS)

La enfermedad causada por CMVh ha sido una de las preocupaciones principales de los médicos dedicados al trasplante. En los años 90, entre el 50 y 70% de los pacientes trasplantados presentaban una infección por CMVh, y de éstos, un tercio desarrollaba la enfermedad. Además, entre el 25-30% de los pacientes tratados presentan una recurrencia. La prevalencia de esta enfermedad va a depender del tipo de trasplante y de la intensidad de inmunosupresión (**Tabla 5**) ^{149,150}, estimándose que en general, más de dos tercios de los receptores de trasplante experimentarán al menos un episodio de infección en el primer año tras el trasplante, con una alta tasa de mortalidad entre el 15%-45% ¹⁵¹.

Tabla 5. Tasa de incidencia de enfermedad por CMV en TOS (modificado de Razonable RR et al)				
Órgano trasplantado	CMV D+/R-		CMV R+	
	Sin profilaxis	Con profilaxis	Sin profilaxis	Con profilaxis
Riñón y/o páncreas	45-65%	6-38%	8-20%	1-2%
Hígado	45-65%	6-29%	8-19%	4-6%
Corazón	29-74%	19-30%	20-40%	2%
Pulmón y pulmón-corazón	50-91%	32% (3 meses) 10% (6 meses) 4% (12 meses)	35-59%	32% <5-10% (6 meses) 4% (12 meses)
Intestino delgado	Datos limitados	7-37%	Datos limitados	7-44%

1.5.5 Transmisión por transfusiones sanguíneas

El síndrome postransfusional por CMVh es un caso especial de mononucleosis adquirida por transfusiones, siendo su hallazgo en la población normal adulta extremadamente inusual. El CMVh puede estar presente en la sangre de donantes sanos, en estado latente en monocitos y reactivarse al transfundirse a otro paciente. En individuos inmunodeprimidos se puede detectar en polimorfonucleares y macrófagos. Sin embargo, se estima que el riesgo de transfusión por unidad de sangre es del 0.38% ¹⁵³, ya que

prácticamente esta vía se encuentra eliminada gracias al uso rutinario de filtros para separar los leucocitos durante las transfusiones ¹⁵⁴.

1.5.6 Transmisión por vía sexual

Es el segundo modelo importante de transmisión horizontal en la pubertad ^{155,156}. Las mayores tasas de seroprevalencia han sido asociadas con el número de parejas sexuales, la edad temprana de la primera relación sexual, no ser de raza blanca, homosexualidad (94% vs 54%), duración de la actividad sexual, historia previa de enfermedades de transmisión sexual y sexo anal ^{157,158,159,160}.

1.6 MANIFESTACIONES CLINICAS

La gran mayoría de las infecciones primarias por CMVh en adultos jóvenes inmunocompetentes pasan clínicamente desapercibidas, son asintomáticas; sin embargo, aquellas que cursan de manera sintomática, el síndrome más común es el síndrome mononucleósico. Éste puede cursar con fiebre prolongada, mialgias, astenia, linfocitosis relativa, aumento de transaminasas, trombocitopenia, anemia; y son poco frecuentes la odinofagia, amigdalitis, esplenomegalia, y adenopatías ¹⁶¹. La mayoría de los pacientes curan de forma espontánea y sin secuelas, pero otras de forma excepcional, desarrollan complicaciones órgano-específicas e incluso enfermedades multisistémicas fulminantes ¹⁶². Entre estas, se han descrito complicaciones gastrointestinales (colitis, esofagitis, gastritis, enfermedad de Menetrier, ileitis, y obstrucción colónica) ¹⁶³⁻¹⁶⁹, complicaciones hepáticas (trombosis de la vena portal, hepatitis aguda, hepatitis granulomatosa) ^{170,171}, complicaciones

INTRODUCCIÓN

neurológicas (encefalitis, meningoencefalitis, síndrome de Guillain-Barré, posible relación enfermedad de Alzheimer) ^{162,172,173}, complicaciones pulmonares [neumonía intersticial ¹⁷⁴, complicaciones cardiovasculares (miocarditis, pericarditis, aterosclerosis, trombosis vascular con o sin embolismo)] ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ y complicaciones oculares (uveitis anterior) ¹⁷⁸.

Al igual que las infecciones primarias en individuos inmunocompetentes, las infecciones primarias por CMVh en embarazadas son asintomáticas en aproximadamente el 80%^{127,179}, presentando aquellas mujeres con infección primaria (59.8%) más a menudo síntomas y alteraciones analíticas que aquellas que presentan infección recurrente (19%) o infección no activa (12%)¹⁸⁰. La infección perinatal por CMVh puede producir una variedad de síntomas, aunque por lo general es asintomática. Normalmente ocurre un síndrome similar a sepsis asociado a hepatoesplenomegalia, analítica alterada con linfopenia, trombocitopenia, neutropenia, transaminasas alteradas, y neumonitis¹⁸¹. Estos síntomas suelen ser transitorios y no tienen efecto en la evolución neonatal como por ejemplo displasia broncopulmonar, enterocolitis necrotizante y crecimiento¹⁸². En cuanto a la infección postnatal al igual que la perinatal, por lo general es asintomática en la mayoría de los niños sanos y adolescentes. Sin embargo, aproximadamente el 10% de infecciones adquiridas por CMVh producen síntomas (fiebre, fatiga, faringitis, adenopatía, hepatitis por hepatomegalia o hepatoesplenomegalia, ictericia leve, cefalea, enteritis, dolor abdominal, diarrea, vómitos, artralgias, rash, etc). Desde el punto de vista analítico, CMVh es una de las causas más frecuentes de neutropenia prolongada en el lactante, y puede manifestarse con linfocitosis, trombopenia, anemia, colestasis, y elevación de proteína C reactiva. Además se han descrito

INTRODUCCIÓN

también complicaciones como hipertensión portal, cirrosis, sangrado gastrointestinal (diagnóstico diferencial con enterocolitis necrotizante), perforación ileal, estenosis colónica, hepatitis granulomatosa, enfermedad de Menetrier, neumonitis (atrapamiento aéreo, infiltrados perihiliares y atelectasia e indistinguible de neumonías atípicas o virus respiratorio sincitial), miopericarditis, anemia hemolítica, síndrome hemofagocítico viral, síndrome Guillain-Barré, meningoencefalitis, afectación multisistémica y muerte ¹³⁹.

A pesar de que la mayoría de las infecciones primarias por CMVh son asintomáticas, la infección por CMVh puede dar lugar a enfermedades serias en un número de pacientes tipo como son los individuos con infección congénita o individuos inmunodeprimidos como los receptores de trasplante, que a continuación desarrollaremos.

1.6.1 Infección congénita

Alrededor del 10% los recién nacidos con infección por CMVh presentan síntomas al nacimiento. Las manifestaciones clínicas pueden variar desde hallazgos no específicos a implicación de órganos, con particular predilección por el sistema nervioso central. En general, todas estas manifestaciones han sido asociadas con diferentes factores tales como el tipo de infección maternal ^{128,183,184}, la carga viral ^{34,35,185-187}, y edad gestacional. Los síntomas más frecuentes al nacimiento son el retraso de crecimiento uterino con bajo peso al nacimiento, petequias, púrpura, ictericia (con alta bilirrubina directa, > 2mg/dl), hepatoesplenomegalia, microcefalia, déficit audiológico, trombocitopenia (<100000/mm³) y transaminemia (AST >80 U/L) ¹⁸⁸. Muy característico, aunque poco frecuente, es la aparición de focos de eritropoyesis extramedular a nivel

INTRODUCCIÓN

subdérmico dando lugar a una erupción papular purpúrica con lesiones entre 2-10mm de diámetro distribuidas por toda la superficie corporal (blueberry muffin baby) ¹³⁵.

Entre las manifestaciones clínicas primarias asociadas con infección congénita por CMVh, la más importante es aquella que implica al Sistema Nervioso Central (SNC), ya que generalmente se cree que los daños son irreversibles. La afectación del SNC aparece en alrededor del 50% de los niños con infección sintomática, pudiendo cursar microcefalia (50%), convulsiones (7-10%), retraso mental, hipoacusia neurosensorial, coriorretinitis, hipotonía, letargia, hiperproteínorrea (>120mg/dl), alteraciones motoras, alteraciones en la postura, temblor, dificultades en la succión o alimentación, y alteración en las pruebas de imagen. Se han descrito anomalías estructurales mediante resonancia magnética, ultrasonogramas, o sonografía fetal como ventrículomegalia, calcificaciones intracraneales, alteraciones de la migración neuronal, vasculopatía de las arterias talamoestriadas, atrofia cerebral, microcefalia, hipoplasia cerebelar, hiper/hipoecogenicidad periventricular, adhesiones ventriculares, quistes periventriculares, protusiones endodiales y cuerpo calloso hipoplástico. Además se han observado anomalías en la sustancia blanca como la pérdida de la capa intermedia, necrosis focal, hemorragia, dilatación intraventricular, gliosis de la materia blanca, atrofia, quistes parenquimales, quistes endodiales, calcificaciones y malformaciones corticales como polimicrogiria, paquigiria, lisencefalia y esquisencefalia ^{135,186}. Mientras que los signos clínicos debido a anomalías del sistema reticuloendotelial como anemia, hepatoesplenomegalia e ictericia son

INTRODUCCIÓN

transitorios, los déficits neurológicos son evidentes al nacimiento o a una edad temprana, y normalmente persisten durante la vida.

Recientemente se ha subrayado la importancia de CMVh congénito como causa de sordera neurosensorial en la infancia (10-20%), siendo la principal causa no genética de sordera en niños ¹⁸⁹. Se estima que la tasa de incidencia es de 0.2-1.3/1000 nacidos vivos ¹⁹⁰, y que más de la mitad de niños nacidos con infección sintomática y el 10% de los asintomáticos desarrollan sordera neurosensorial de nivel medio o severo siendo progresiva en el 50% de los casos, y probablemente mayor con la edad ¹⁹¹⁻¹⁹³. Entre los sintomáticos, la mayoría tienen sordera bilateral, sin embargo en los asintomáticos, predomina la sordera unilateral. La sordera bilateral provoca déficit en el lenguaje y retraso en el aprendizaje, cuya severidad es directamente proporcional al retraso en el diagnóstico para una posterior rehabilitación. La naturaleza progresiva de la sordera neurosensorial sugiere que quizás exista una infección crónica en el SNC o en el oído interno que continúa siendo activo a lo largo de toda la infancia. Se cree que es originada por una laberintitis inducida por el virus ¹⁹⁴, y de hecho, cuando se realiza un análisis histológico del oído interno de los niños infectados congénitamente, se observa daño en estructuras tales como el sistema endolinfático vestibular y los órganos vestibulares como sáculo, utrículo y colapso de la membrana sacular ¹⁹⁵.

También se han descrito anomalías oculares que incluyen coriorretinitis (uveítis posterior), cicatrices retinianas, estrabismo, atrofia óptica y pérdida de visión central ¹³³.

Por último, se han reportado tasas de mortalidad que oscilan entre el 3-7% en pacientes con infección sintomática ^{33,135,192,196} debiéndose

principalmente a disfunción hepática o cerebral grave, a hemorragia por trombocitopenia intensa o a coagulación intravascular diseminada e infecciones bacterianas secundarias ^{135,197}.

1.6.2 Infección en el receptor de trasplante de órgano sólido

La infección por CMVh es una causa mayor de morbilidad en pacientes receptores de trasplante de órgano sólido. Sin alguna forma de prevención, la infección por CMVh primariamente ocurre en los 3 primeros meses tras el trasplante. La Sociedad Americana de trasplante define dos conceptos ¹⁵⁰:

- Infección por CMVh: evidencia de la replicación CMVh en ausencia de síntomas.
- Enfermedad por CMVh: evidencia de infección por CMVh con síntomas atribuibles. Esta enfermedad puede ser categorizada en síndrome viral con fiebre y/o malestar general, leucopenia, trombocitopenia; o bien enfermedad invasora (neumonitis, hepatitis, retinitis, enfermedad gastrointestinal).

La infección por CMVh exhibe un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde una infección asintomática de bajo grado (normalmente asociado a baja carga viral), a una infección severa, ampliamente diseminada y potencialmente fatal (alta carga viral) ¹⁹⁸.

Las manifestaciones clínicas se agrupan en dos categorías: aquellas ocasionadas por la acción directa del propio virus, que comprenden el síndrome vírico y la enfermedad invasora. Por otro lado, las indirectas, atribuidas a los efectos del CMVh sobre el sistema inmunitario del paciente, que incluyen la asociación con otras infecciones y con diferentes formas de disfunción del injerto ¹⁶¹ (**Tabla 6**). La presentación clínica más frecuente de la

INTRODUCCIÓN

enfermedad por CMVh es el síndrome vírico por CMVh que se caracteriza por fiebre igual o mayor de 38°C, malestar general, anorexia, mialgias, y artralgias que a menudo es acompañado por leucopenia, trombocitopenia, linfocitosis atípica y elevación de las transaminasas. Sin tratamiento se autolimita tras 3-4 semanas, o bien progresa hacia una enfermedad invasora. Las manifestaciones clínicas del síndrome vírico son inespecíficas y plantean un diagnóstico diferencial amplio que incluye las infecciones producidas por otros microorganismos oportunistas, el rechazo agudo y la toxicidad por fármacos 161,198 .

La enfermedad invasora se define por la presencia de una infección localizada confirmada por la demostración de células de inclusión citomegálica o la detección *in situ* de antígeno de CMV o ADN por inmunohistoquímica o hibridación en la biopsia, y signos y síntomas de disfunción del órgano del que se ha tomado la muestra. De esta forma, se establece el diagnóstico de la hepatitis, esofagitis, gastroenteritis, colitis y neumonía.

Tabla 6. Manifestaciones clínicas e impacto de la infección tras el trasplante de órgano sólido (adaptado de [198,199])	
EFFECTOS DIRECTOS	EFFECTOS INDIRECTOS
Síndrome vírico por CMV	Rechazo agudo
Enfermedad invasora por CMV	Rechazo crónico
Enfermedad gastrointestinal (más común)	Bronquiolitis obliterante (Trasplante pulmonar)
Hepatitis	Vasculopatía coronaria (Trasplante cardíaco)
Neumonitis	Fibrosis tubulointersticial/ nefropatía crónica injerto (Trasplante renal)
Nefritis	Síndrome del conducto biliar o trombosis arteria hepática (Trasplante hepático)
Pancreatitis	Infecciones oportunistas
Carditis	Infección fúngica
Enfermedad SNC	Infección bacteriana
Retinitis (poco frecuente)	Síndrome linfoproliferativo asociado a virus Epstein-Barr
Enfermedad multiorgánica	Recurrencia acelerada por virus Hepatitis C (Trasplante hepático)
Mortalidad	Infección viral (HHV-6 y HHV-7)
	Eventos cardiovasculares
	Diabetes mellitus
	Riesgo aumentado de muerte

1.7 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE LABORATORIO

El diagnóstico de la infección por CMVh es establecido por la demostración o el aislamiento del virus en el cultivo, o la demostración del antígeno viral o ácido nucleico en muestras clínicas ²⁰⁰. Las muestras clínicas habituales para el estudio de CMVh son orina, saliva, sangre completa, plasma, suero, lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquídeo y tejido. Como regla general, la muestra en la que se investigue la presencia de agentes virales debe de ser procesada lo antes posible. Cuando ha de ser almacenada, debe mantenerse refrigerada (4-8°C) hasta su procesamiento. Si este se demora más de 48 horas después de su obtención se conservarán a temperaturas de -80°C o menores, nunca a -20°C o -40°C.

1.7.1 Histopatología

Este método parece ser el método de referencia para el diagnóstico de enfermedad invasora tisular por CMVh. El efecto citopático producido por el CMVh en las células es muy característico, observándose agrandamiento nuclear y celular, y presencia de inclusiones citoplasmáticas (agregados de nucleoproteínas que se producen durante la replicación viral) en biopsias tisulares. Para facilitar la identificación histopatológica de las células infectadas por CMVh suele utilizarse hibridación *in situ* mediante sondas ADNc CMV específicas; o inmunohistoquímica mediante el uso de anticuerpos monoclonales y policlonales contra antígenos tempranos de CMV, o bien con tinciones de hematoxilina o eosina ^{201,202}. El inconveniente de este método es que requiere procedimientos invasivos para la obtención de una buena

muestra. Por ello, muchos clínicos son a menudo reticentes a realizarla y se basan en la demostración de CMVh en sangre periférica mediante PCR o antigenemia en pacientes con signos y síntomas compatibles con enfermedad por CMVh. Un caso especial es la biopsia del aloinjerto, que es altamente recomendada si el rechazo del injerto es considerado en el diagnóstico de un paciente con viremia por CMVh, así como cuando el diagnóstico en sangre periférica es negativo en casos con enfermedad CMVh localizada ¹⁹⁸.

1.7.2 Diagnóstico serológico

Los pacientes infectados por CMVh desarrollan una respuesta humoral bastante precoz, con producción de IgM e IgG, que son la base del diagnóstico serológico. Este método se basa en la detección de anticuerpos frente a CMVh en suero. Existen numerosos métodos para su detección como inmunofluorescencia o fijación de complemento entre otros, que actualmente han quedado relegados por métodos de enzimoimmunoanálisis (EIA).

Un diagnóstico de CMVh reciente o agudo es considerado probable cuando se detecta IgM, o cuando en muestras pareadas obtenidas en al menos 2 ó 4 semanas de separación, se observa seroconversión con una diferencia ≥ 4 en títulos de IgG CMV. Los anticuerpos IgM son detectables normalmente en las 2 primeras semanas tras el desarrollo de síntomas, y pueden persistir normalmente durante 4-6 meses. Sin embargo, la detección de anticuerpos IgG no son a menudo detectables hasta 2 ó 3 semanas tras el comienzo de los síntomas, y persisten a lo largo de toda la vida ²⁰³.

1.7.2.1 Serología de la embarazada

Hasta la fecha no hay guías clínicas universales donde se acepte el realizar pruebas serológicas frente a CMVh periódicamente, de tal forma que sigue existiendo el debate de realizar o no cribado universal serológico en las gestantes. De hecho, el cribado universal de CMVh podría ser instaurado si existiera un tratamiento que previniera o minimizara las secuelas, que fuera aceptado, seguro, coste-efectivo, y que redujera el riesgo de CMVh congénito entre las mujeres seronegativas, como ocurre en el caso de rubéola, hepatitis B o sífilis ^{204,205}. Además, no existe ninguna vacuna disponible para prevenir la infección, y en mujeres seropositivas es difícil distinguir entre una infección primaria y no primaria.

Los anticuerpos IgG frente a CMVh en el suero en la primera serología de embarazo (8^a-10^a semana) indica infección pasada, y no se necesitan más estudios salvo que existan condiciones clínicas tales como hallazgos ultrasonográficos anormales. Incluso aunque no ofrece protección total, la inmunidad adquirida protege a la madre de la infección primaria en el embarazo, lo que implica un mayor riesgo de daño fetal. Cualquier reinfección o reactivación de la infección conlleva el mismo riesgo que el embarazo en sí mismo ²⁰⁶.

La detección de anticuerpos IgM frente a CMVh es un marcador sensible de infección primaria por CMVh, pero su especificidad es relativamente baja, sólo aproximadamente el 50% de los individuos IgM CMVh positivos tienen una infección primaria. De hecho, anticuerpos IgM frente a CMV se han detectado en mujeres embarazadas 6 a 9 meses tras el final de la fase aguda de una respuesta inmune primaria, y los falsos positivos pueden

INTRODUCCIÓN

ocurrir en pacientes tras infecciones virales como virus *Epstein-Barr* o *Erythrovirus* B19, en caso de enfermedades autoinmunes o por métodos de laboratorio ²⁰⁷. Por ello, diversos estudios muestran la avidéz IgG como un marcador sensible y específico de infección primaria ^{126,127}, y de hecho está aumentando su uso como el patrón de oro para distinguir entre infección primaria y no primaria ²⁰⁷. Normalmente, esta determinación mide la proporción de moléculas policlonales IgG unidas a los epítomos antígenicos múltiples de proteínas tras la desnaturalización mediante urea 6M ²⁰⁸. Dependiendo de los puntos de corte utilizados por los sistemas comerciales para la detección de la avidéz IgG: una baja avidéz (~20-45%) indicaría infección primaria dentro de los 3-4 meses con un riesgo aumentado de transmisión intrauterina al feto/recién nacido, siendo el 100% sensible antes de la 16ª semana de gestación, valor que se reduce drásticamente a partir de esa semana (62.5%) ²⁰⁹. Una alta avidéz (~50-65%) durante el primer trimestre (12ª-16ª semana) excluye una infección primaria postconcepcional, e indica un bajo riesgo de transmisión intrauterina. Sin embargo, una avidéz intermedia y/o alta avidéz durante el segundo o tercer trimestre de embarazo no descarta la infección primaria postconcepcional estando asociada a un mayor riesgo de transmisión (Figura 9) ²¹⁰.

INTRODUCCIÓN

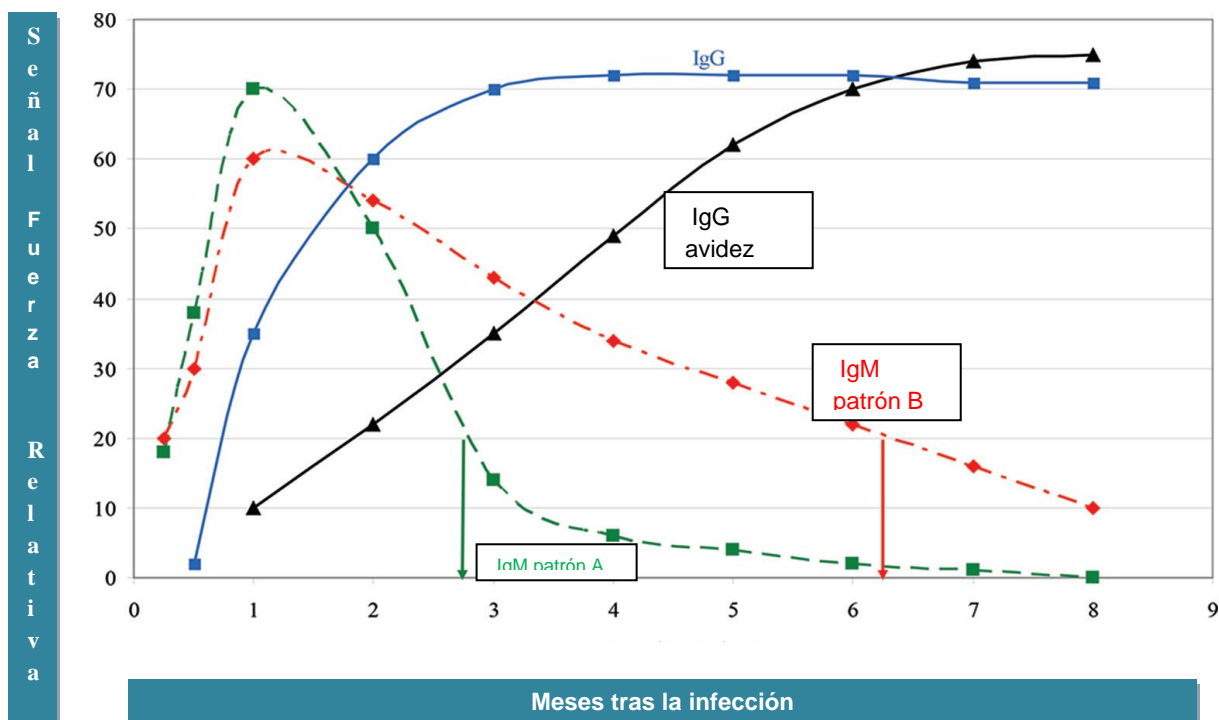


Figura 9. Variaciones de los niveles de anticuerpos IgM, IgG e IgG avidez. El patrón IgM A representa la típica respuesta IgM (3-4 meses de persistencia), mientras que el patrón IgM B muestra la persistencia de la IgM a lo largo plazo. El nivel bajo de avidez CMV IgG indicaría infección primaria en los tres meses previos y una alta avidez indicaría infección primaria hace más de 6 meses (adaptado de [210])

Parecería razonable realizar un estudio serológico mensualmente en las mujeres seronegativas hasta la semana 18^a-20^a de gestación. Si la madre continuara siendo seronegativa, el seguimiento serológico puede ser limitado o confinado a una prueba más a las 35^a-37^a semana para seleccionar recién nacidos en riesgo de infección congénita en el caso de seroconversión tardía. Atendiendo a todas las razones expuestas en este apartado, diversos autores han propuestos algoritmos de seguimiento-manejo para el cribado universal de las embarazadas (Figura 10 y 11).

INTRODUCCIÓN

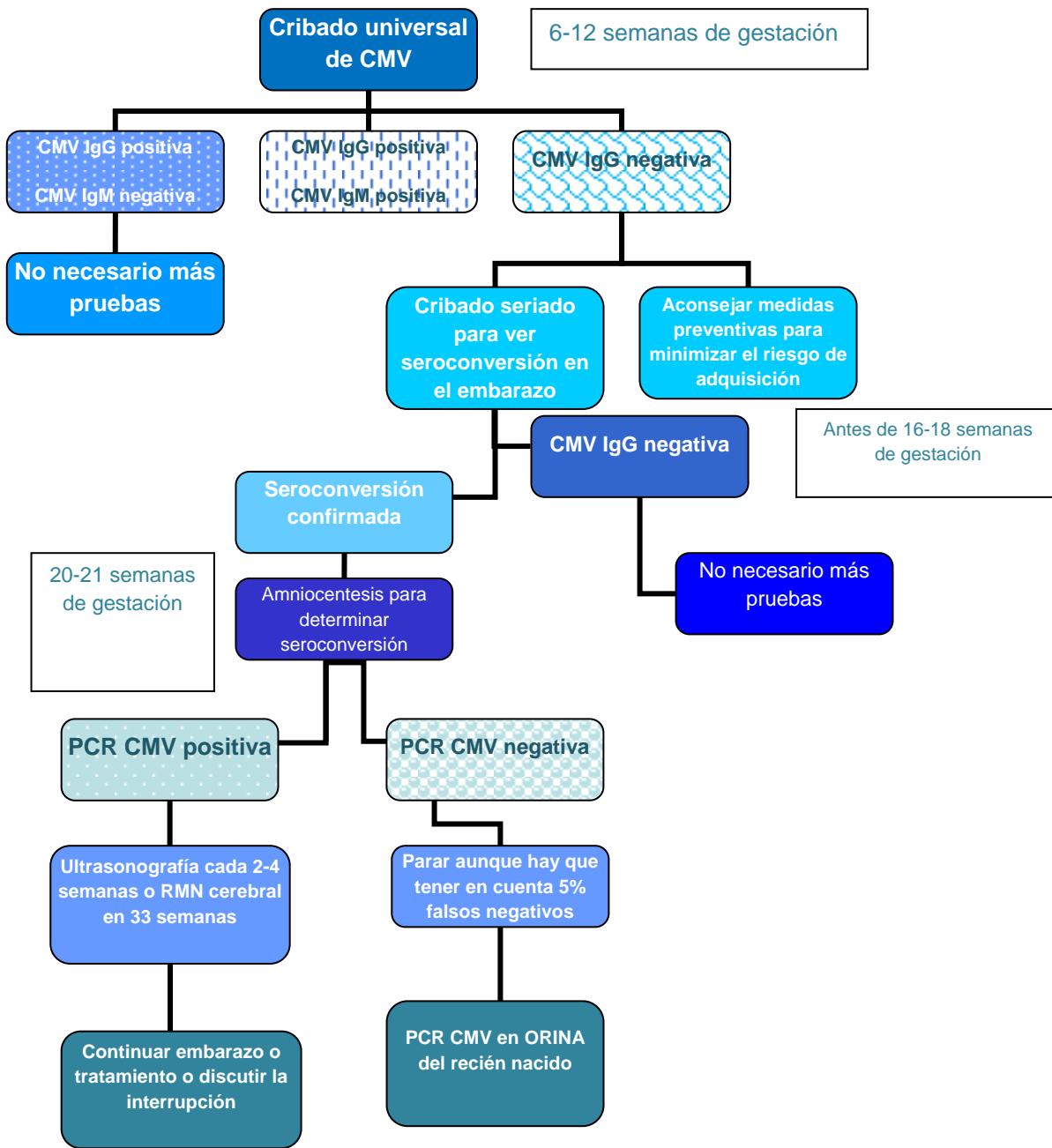


Figura 10. Algoritmo propuesto de cribado universal de CMVh (adaptado de [205,206,211])

INTRODUCCIÓN

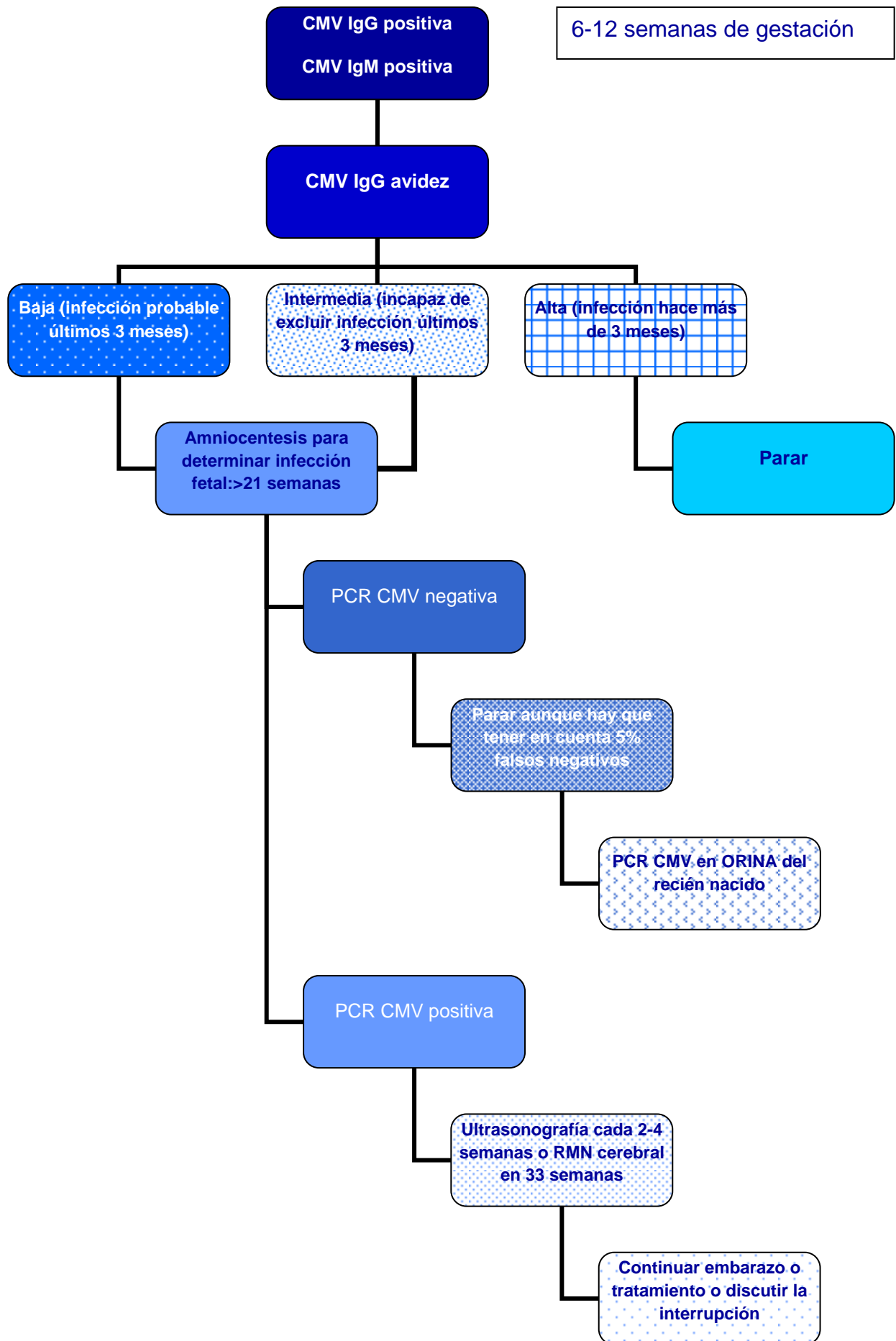


Figura 11. Algoritmo propuesto del manejo de mujeres con IgG CMV positiva e IgM CMV positiva (adaptado de [205,206,211])

INTRODUCCIÓN

1.7.2.2 Serología del recién nacido

La detección de antigenemia o anticuerpos IgM CMVh en el recién nacido puede diagnosticar la infección congénita, pero los anticuerpos sólo están presentes en el 20-70% de los niños infectados ¹²⁷, mostrando valores de sensibilidad y especificidad inferiores al 30-40% y 70%, respectivamente ¹³⁵. Después de las dos semanas de vida, las pruebas serológicas no logran distinguir entre infección prenatal y perinatal, y el diagnóstico de infección congénita sólo puede intuirse clínicamente, además la negatividad de las pruebas no excluye el diagnóstico de infección congénita.

1.7.2.3 Serología de la infección postnatal

La determinación de IgM CMV puede ser útil, aunque su positividad no la confirma, su ausencia no descarta infección. Sin embargo, la detección de anticuerpos IgG CMV en los primeros 9-12 meses de edad habitualmente se traduce en la transmisión transplacentaria de anticuerpos maternos por lo que no es útil.

1.7.2.4 Serología en receptores de trasplante de órgano sólido

En general, la serología es útil en la determinación del estado inmunitario en el cribado de donantes y receptores de órganos, aunque tiene muy poco valor para el diagnóstico de la infección sintomática, muy en particular si se trata de reactivaciones de una infección latente ¹⁹⁸. El conocimiento del estado serológico de IgG CMV del donante y receptor guía la estratificación de los pacientes de receptores de trasplante de órgano sólido en diferentes categorías de riesgo de enfermedad por CMVh: alto riesgo (D+/R-),

moderado riesgo (D+/R+ o D-/R+), y bajo riesgo (D-/R-). El realizar la serología CMV IgG e IgM no se recomienda para el diagnóstico de infección activa o enfermedad en estos pacientes ni para la monitorización del curso clínico o respuesta al tratamiento. La utilidad clínica de la serología de CMVh para establecer la seroconversión o la falta de la misma en pacientes CMV D+/R-, ha sido establecida como potencial predictivo de enfermedad por CMVh de comienzo tardío ²¹². Por tanto, no se recomienda el uso de la serología en el período postrasplante, pero sí en el período pretrasplante.

Además, en trasplante se han descrito diferentes métodos de medida y cuantificación de respuesta celular (linfocitos CD8+ y CD4+), que reconocen epítomos específicos de CMV: tinción de tetrámeros o citocinas intracelulares, citometría de flujo, ELISPOT® y Quantiferon®-CMV. Este último es el más recomendado y mide los valores de IFN-γ producido por los linfocitos TCD8+ cuando se estimulan *in vitro* con un pool de péptidos virales inmunogénicos de CMV ²¹³.

1.7.3 Cultivo celular

CMVh puede ser aislado de múltiples muestras como sangre, líquido cefalorraquídeo, lavado broncoalveolar, orina y biopsias. No son muchas las líneas celulares que soportan el crecimiento del CMVh, siendo las líneas diploides de fibroblastos de pulmón embrionario humano (Medical Research Council 5; MRC-5) las más utilizadas. El cultivo viral convencional tiene diversas limitaciones como el lento crecimiento (son necesariamente entre 1-6 semanas para observar el efecto citopático dependiendo de la carga viral

INTRODUCCIÓN

presente)²¹⁴ y la falta de sensibilidad sobre todo cuando se cultivan leucocitos de sangre periférica.

El cultivo convencional ha sido sustituido en la práctica por la variante conocida como *shell vial*. Es un método rápido de cultivo basado en la centrifugación a baja velocidad y detección de antígeno inmediato-temprano, mediante tinción fluorescente previamente al desarrollo del efecto citopático en cultivo convencional. La centrifugación incrementa la proliferación celular, disminuye los tiempos de división celular, activa la expresión genética celular y altera su metabolismo²¹⁵. Tras la centrifugación de las muestras clínicas para aumentar la absorción del virus, las monocapas celulares en este caso de MRC-5 crecidas en un cubreobjetos circular depositado en un tubo de fondo plano, se incuban durante 2-3 días y son expuestas a anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos virales de fase inmediata precoz (CMV p72). La unión de los anticuerpos será indicativo de replicación temprana dentro de las células²¹⁴.

Este método suele ser más útil en el caso del diagnóstico de infección congénita y enfermedad invasora tisular. El cultivo de orina del recién nacido en las 2 primeras semanas de vida es útil ante la sospecha de infección congénita. Sin embargo, un cultivo de orina positivo tomado después de los 21 días de vida no puede asegurar que se trate de una infección congénita, ya que la adquisición ha podido ser perinatal también¹³⁵. En otro tipo de muestra como es el líquido amniótico, la sensibilidad del cultivo viral mediante *shell vial* muestra una sensibilidad del 50 al 62.5% y una especificidad del 100% comparado con la PCR¹²⁷.

INTRODUCCIÓN

Un cultivo de sangre positivo es muy específico y predictivo de enfermedad por CMVh ²¹⁶. Sin embargo, la detección de CMVh en otros sitios indica la presencia del virus, pero no confirma la enfermedad activa por CMVh. CMVh puede ser excretado en la orina intermitentemente durante meses tras una infección aguda incluso en individuos sanos. Los individuos inmunosuprimidos a menudo excretan virus en la orina y otras muestras, como heces o lavado broncoalveolar durante períodos prolongados de tiempo en ausencia de enfermedad ¹⁹⁹. Por lo que en la práctica, el valor predictivo de los métodos de cultivo puede ser subóptimo en ciertos pacientes y muestras clínicas como orina, saliva o secreciones respiratorias de pacientes inmunodeprimidos. Asimismo, se considera el mejor procedimiento para el diagnóstico con afectación orgánica en inmunodeprimidos, siempre y cuando se utilice la muestra adecuada, como el lavado broncoalveolar en neumonitis o la biopsia de colon en colitis.

1.7.4 Prueba de antigenemia

La detección antigénica de CMVh en sangre es el método fenotípico más usado en los receptores de trasplante de órgano sólido. Esta técnica emplea anticuerpos monoclonales específicos fluorescentes para la fosfoproteína de la matriz o tegumento pp65 (codificada por UL83), una proteína estructural tardía expresada en los leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica infectados durante la fase temprana del proceso de replicación viral de CMVh ²⁰⁰. Los resultados son informados como el número de células teñidas positivas por el número total de células contadas. Suelen estar en 24 horas, y la prueba se realiza en pacientes VIH y en receptores de trasplante de órgano sólido, ya que

INTRODUCCIÓN

en estos pacientes parece ser que se correlaciona con la viremia ^{217,218}. A causa de que pp65 es secretada durante la replicación viral, su detección en leucocitos de sangre periférica, generalmente indica infección activa.

La prueba de antigenemia es más sensible que el cultivo en la detección de CMVh en sangre ²¹⁷⁻²¹⁹. Es capaz de detectar la infección por CMVh de manera más temprana que el cultivo viral (5-14 días antes del comienzo de la enfermedad por CMVh). Por otro lado, existen numerosos estudios comparando la antigenemia y PCR, algunos de ellos afirmando que las sensibilidades son comparables ^{220,221}, y otros que la antigenemia muestra sensibilidades menores (26-39%) ²²²⁻²²⁴.

La antigenemia de CMVh puede ser usada para detectar precozmente la replicación de CMVh y guiar el inicio de la terapia anticipada. Los pacientes son monitorizados regularmente (normalmente 1 vez a la semana los primeros meses). Una vez que la antigenemia es positiva y previo a los síntomas, los receptores de TOS son tratados con antivirales para evitar la progresión de una infección asintomática a enfermedad clínica. Diversos estudios han demostrado que un alto número de células positivas se correlaciona con el riesgo de desarrollar enfermedad activa (10 a 20 células positivas/200.000 leucocitos) ^{225,226}. Sin embargo, algunos estudios demuestran que un paciente con pocas células positivas puede desarrollar enfermedad, y en otros casos con un alto número puede resolverse la infección espontáneamente sin tratamiento antiviral ²²⁷. No obstante, a la hora de interpretar estos valores, se debe de tener en cuenta el tipo de trasplante (más bajos para el trasplante de pulmón o intestinal, más altos en el cardíaco), así como las consideraciones internas de

INTRODUCCIÓN

cada centro, la pauta de inmunosupresión empleada o la variabilidad técnica del laboratorio.

La antigenemia de CMVh también ha sido usada para monitorizar el tratamiento antiviral y determinar el final del tratamiento, hasta que no se detecte o sea menor que el punto de corte. El número de células positivas va disminuyendo durante el tratamiento, aunque unos pocos estudios muestran picos de antigenemia durante las dos primeras semanas de tratamiento, pero esto no necesariamente implicaría el fracaso del mismo ¹⁹⁸.

Las limitaciones de la antigenemia incluyen laboriosidad, interpretación subjetiva, falta de estabilidad en sangre completa (procesamiento dentro de las 6 primeras horas), falta de sensibilidad cuando el paciente tiene un conteo de neutrófilos bajos (<1000 células/ μ l) ¹⁹⁹. La mayor sencillez y grado de automatización de los métodos moleculares han hecho que algunos laboratorios hayan dejado a un lado este método.

1.7.5. Métodos de amplificación genómica

La PCR desarrollada en 1985 ha permitido evitar problemas como el retraso en el diagnóstico, la falta de sensibilidad de los métodos convencionales y la dificultad de crecer de diferentes microorganismos *in vitro*. Estas técnicas se basan en diferentes etapas secuenciales: extracción, retrotranscripción (si ARN), amplificación y detección. En la primera etapa, se extraen los ácidos nucleicos mediante diferentes métodos como el calor, detergentes, sílice, proteinasa K o fenol-cloroformo. En la segunda etapa, se utilizan el ADN diana, oligonucleótidos o cebadores o “primers”, la enzima de polimerización, mezcla de dideoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) y el

INTRODUCCIÓN

cofactor enzimático Mg^{2+} . Se amplifica la secuencia diana presente en la muestra en forma exponencial gracias a tres ciclos de temperatura donde el ADN se desnaturaliza, los cebadores se hibridan con la secuencia diana y la enzima permite la síntesis de una hebra de ADN complementaria. En la tercera etapa, se detecta el producto amplificado mediante electroforesis en geles de agarosa o sondas de hibridación, comprobando de esta manera el tamaño del amplicón. Los inconvenientes de la PCR son la probabilidad de contaminación cruzada y la presencia de inhibidores de la reacción, solventados mediante el uso normalmente de reactivos enzimáticos (Uracil-N-glicosilasa) y el uso de controles internos, respectivamente. Más recientemente, ha surgido una variante de la PCR convencional, PCR en tiempo real, la cual combina la amplificación y la detección del amplicón simultáneamente, mediante el uso de moléculas de fluorescencia. Los sistemas de detección de fluorescencia pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes (SYBR green I) y sondas específicas marcadas con fluorocromos (Taqman, FRET, Molecular beacons). El inconveniente de los primeros es la baja especificidad (presencia de primer dimers), sin embargo con estos equipos es posible determinar la temperatura de fusión o melting que puede ser útil para mejorar dicha especificidad ²²⁸.

1.7.5.1 Diagnóstico prenatal de infección congénita

Una vez que la infección maternal ha sido documentada, es importante conocer si la infección fetal se ha producido. Aunque se utilizan métodos ultrasonográficos, muchos hallazgos compatibles con infección por CMVh pueden ser vistos con otras infecciones o condiciones que afecten al feto. Comparado con la ultrasonografía, el aislamiento de CMVh a partir del líquido

INTRODUCCIÓN

amniótico presenta los mayores valores de sensibilidad, y es considerado el “patrón de oro” del diagnóstico prenatal ¹²⁷.

La amniocentesis fue introducida por Davis en 1971, debiéndose realizar a partir de la semana 21^a de gestación, ya que el feto empieza a excretar orina al líquido amniótico a partir de la semana 19^a-20^a ²⁰⁷. Este período ha sido elegido porque CMVh es un virus de replicación lenta y la enfermedad es más severa si la infección es contraída en las primeras 12-16 semanas de gestación. Un estudio muestra la diferente sensibilidad si la muestra de líquido amniótico es tomada antes o después de las 21 semanas (30% vs 71%) ²²⁹. Además, es necesario que la amniocentesis se realice al menos 6-7 semanas tras la fecha teórica de infección materna para que el riñón fetal produzca la suficiente cantidad de virus para que pueda detectarse ^{229,230}. Este intervalo de tiempo de 6-7 semanas, refleja la infección placentaria, la replicación, la transmisión al feto, la replicación viral en el riñón fetal, y la excreción al líquido amniótico.

El diagnóstico de la infección fetal por CMVh debería basarse en el cultivo y/o PCR en líquido amniótico. El aislamiento de CMVh mediante cultivo es indicativo de infección congénita pero este método es menos sensible (70-80%), por lo que puede haber falsos negativos, debido fundamentalmente a un transporte y mantenimiento de la muestra inadecuado. Hasta la fecha, la mejor técnica diagnóstica es la determinación de la carga viral en líquido amniótico mediante PCR, que presenta una excelente sensibilidad (70-100%) y especificidad (90-98%), por lo que un resultado positivo confirmaría la infección fetal ^{207,231,232}. Por otro lado, nunca se han reportado falsos positivos salvo en dos ocasiones en una serie de 96 niños no infectados, posiblemente por

INTRODUCCIÓN

contaminación del líquido amniótico con otros fluidos, aunque es extremadamente raro ²³². Todo esto indica que la detección de CMVh en líquido amniótico debe ser considerada como un marcador de infección fetal y congénita por CMVh.

Uno de los marcadores que han sido estudiados como factor pronóstico es la determinación de la carga viral en líquido amniótico. Diversos estudios han demostrado que puede ayudar a distinguir los fetos infectados asintomáticos de los sintomáticos, siempre y cuando la toma de muestra se realice en el momento adecuado. De hecho, algunos autores han estimado que cargas virales de CMVh de más de 1.000 copias/ml son 100% predictivas de infección fetal, mientras que un nivel de más de 100.000 copias/ml es predictivo de infección sintomática ^{207,230}.

No se puede terminar este apartado sin hablar de otra alternativa de diagnóstico como la cordocentesis. La cordocentesis fue introducida por Dafos en los años 80, y es usualmente realizada a las 17ª semana de gestación, siendo una técnica invasiva que representa complicaciones como el sangrado, bradicardia fetal (7-9%), parto prematuro (2-5%) y aborto espontáneo (1.7-1.9%) ¹²⁷, siendo este riesgo mayor que con la amniocentesis (1-3% *versus* 0.5-1%) ²²³. La sangre fetal puede ser usada para la determinación de IgM CMVh y la cuantificación de la carga viral. La IgM CMVh de la sangre fetal puede ser determinada tras las 20 semanas de gestación y es útil incluso a pesar de que tiene un limitado valor diagnóstico debido a su baja sensibilidad (25-75%) ¹²⁷. Al igual que la amniocentesis, la IgM CMVh y la determinación de carga viral en sangre fetal presentan valores más elevados en aquellos fetos con anormalidades ^{234,235}. Se han descrito en sangre fetal valores de

INTRODUCCIÓN

especificidad y de valor predictivo positivo (antigenemia, viremia, ADNemia, ARNm pp67, ARNm immediate-early, IgM) del 100%, mientras que los valores de sensibilidad (41.4-84.8%) y de valor predictivo negativo (64.6-84.6%) varían, obteniéndose valores superiores en la ADNemia y ARNm immediate early ¹²⁷. Sin embargo, la cuantificación de viremia o antigenemia en la embarazada no tendría utilidad para detectar la posible transmisión vertical por la baja sensibilidad reportada en diversos estudios ¹²⁷.

Por tanto, los resultados negativos en el diagnóstico prenatal utilizando la amniocentesis, pueden descartar CMVh en casi el 100% de los casos estudiados, pudiendo ser usada en casos de infección maternal primaria o secundaria, considerando cuidadosamente el riesgo-beneficio de realizarla en una infección secundaria.

1.7.5.2 Diagnóstico postnatal de la infección congénita

El diagnóstico en el recién nacido se realiza mediante el aislamiento del virus o detección del ADN viral en muestras de orina, saliva, sangre o líquido cefalorraquídeo. El patrón de oro del diagnóstico de infección congénita tras el nacimiento es el aislamiento del virus en fibroblastos en las 2 primeras semanas de vida ¹²⁷. La orina y la saliva son las muestras clínicas de elección para el cultivo. La orina puede ser almacenada a 4°C durante 7 días disminuyendo la tasa de aislamiento a sólo un 93%, mientras que el almacenamiento a temperatura ambiente o mediante congelación disminuye la infectividad ²³⁶. El cultivo mediante shell vial es el más empleado por su rapidez (24h) y especificidad, mostrando una sensibilidad del 94.5% cuando se comparaba con el cultivo viral convencional en una serie de 1.676 recién

INTRODUCCIÓN

nacidos ²³⁷, al igual que cuando se utiliza saliva ²³⁸. Por lo que si existe una elevada sospecha clínica debe repetirse en una segunda muestra o realizar PCR en orina, ya que en algunos estudios es considerada la técnica de referencia.

La PCR fue usada por primera vez para la detección de CMVh en orina de niños con infección congénita a finales de los 80 ²³⁹. Diversos estudios han comparado el cultivo viral mediante shell vial con la PCR en tiempo real en orina obteniendo valores de sensibilidad de PCR del 94.1-100% cuando se consideraba el cultivo como método de referencia, frente al 61.5-100% del cultivo cuando se consideraba la PCR ²⁴⁰. Se ha sugerido la posibilidad de que la PCR sea considerada el método de referencia en la diagnosis postnatal de la infección congénita ²⁴¹, habiéndose descrito que la carga viral en orina es significativamente más baja en aquellos niños con infección postnatal, que en niños con infección congénita, indistintamente de los síntomas clínicos ²⁴².

Estos resultados obtenidos con orina, han llevado a los virólogos a proponer la detección de ADN viral en sangre de los recién nacidos infectados congénitamente por CMVh debido a los valores de sensibilidad y especificidad ^{235,243}. En 1994 Shibata y colaboradores propusieron una manera simplificada de detección del ADN viral en gotas de sangre seca en papel absorbente (Dried blood spots: DBS) ²⁴⁴. Este material es usado para la realización de la prueba de detección precoz neonatal de desórdenes metabólicos o genéticos en todos los recién nacidos (prueba del talón, tarjeta de pruebas metabólicas, Guthrie cards). Cuando más allá de los primeros 15 días de vida se plantea la posibilidad diagnóstica de una infección congénita por CMVh, es de gran utilidad para establecer un diagnóstico diferencial con las formas postnatales

INTRODUCCIÓN

disponer de una muestra del período neonatal en la que poder determinar la presencia de CMVh. Para ello se han utilizado las tarjetas de pruebas metabólicas Guthrie, las cuales han sido validadas para el estudio retrospectivo de CMVh congénito en diferentes países demostrando sensibilidades que oscilan entre el 34 y el 100% como se ha publicado en los cinco estudios más amplios de la literatura ²⁴⁵, estimándose una tasa de falsos positivos del 1.5-1.9%. Pese a ser una población muy distinta, un estudio publicado en 2013 muestra una aceptable correlación entre la carga viral en sangre fresca y sangre seca en papel absorbente en pacientes trasplantados ²⁴⁶. Este método en el que se incorpora la muestra biológica en papel absorbente, ha sido aplicada a saliva y a orina también. La saliva y la gota de saliva seca de recién nacidos han mostrado una excelente sensibilidad y especificidad ²⁴⁷ en un estudio prospectivo multicéntrico mediante PCR en tiempo real, por lo que este estudio concluyó que la PCR tanto en saliva como en saliva seca deberían ser considerados como herramientas de cribado para CMVh en recién nacidos.

Al igual que con sangre y saliva, este método ha sido propuesto con la orina; incluso se ha investigado productos metabólicos de la orina. En el caso de la gota seca de orina, autores japoneses han demostrado que puede ser útil como herramienta de cribado de infección congénita simplemente insertando un papel de filtro dentro del pañal del recién nacido ²⁴⁸. Sin embargo, la falta de estandarización de la recogida de la muestra limita su uso, aunque actualmente otros autores han intentado estandarizar dicho método ²⁴⁹. También, se ha considerado su utilidad no sólo para la detección de CMVh sino para monitorizar las cargas virales, especialmente de niños tratados con infección congénita, ya que excretan virus de meses a años en orina y saliva ^{187,248,250}.

INTRODUCCIÓN

En cuanto a los productos metabólicos de la orina, un estudio reciente incluyó un recién nacido con el objetivo de observar el impacto de la infección por CMVh (n=23 niños de madres con infección primaria) sobre el metaboloma urinario mediante el uso de resonancia magnética nuclear (RMN-¹H), lo que dio lugar a una huella metabólica característica de la infección congénita (niveles aumentados de mioinositol, glicina, 3-hidroxibutarato, 3-aminoisobutarato, creatina, taurina y betaína), sugiriendo que con un mayor número de estudios podría ser una buena herramienta para el conocimiento de los diferentes patrones metabólicos y la evolución-severidad de la enfermedad ²⁵¹.

1.7.5.3 Diagnóstico de la infección postnatal o adquirida

Al igual que la infección congénita, el diagnóstico se basa en el aislamiento del virus o la identificación del genoma mediante PCR en muestras biológicas como orina, saliva, suero, sangre, líquido cefalorraquídeo, biopsia, heces o lavado broncoalveolar. Esta es útil para identificar a los pacientes con cargas virales más altas y monitorizar así el curso de la infección con o sin tratamiento. Como se ha comentado en anteriores apartados el diagnóstico diferencial entre congénita y adquirida puede ser complicado, la adquirida no suele suponer un riesgo de secuelas a largo plazo y la congénita sí. Para ello, si tenemos un cultivo o PCR negativos en las dos primeras semanas de vida y una determinación positiva posterior, hablaríamos de adquirida. Si no disponemos de orina en las 2 primeras semanas, podemos recurrir a la prueba del talón para descartar infección congénita. Si no tenemos disponibilidad de la misma, también apoyaría el diagnóstico de infección postnatal la sintomatología pasadas las primeras semanas de vida como neumonitis o enteritis, la

detección de virus en lavado broncoalveolar o en biopsia intestinal, y el aumento de la carga viral en sangre u orina o antigenemia en 2 muestras sucesivas¹³⁹.

1.7.5.4 Diagnóstico en el receptor de trasplante de órgano sólido

Hoy en día, la PCR en tiempo real es la técnica molecular de elección, siendo la más empleada para la cuantificación de ADN de CMVh en muestras clínicas. Este tipo de pruebas van a ser útiles en el periodo postrasplante con el objetivo de perseguir la detección de infección activa (replicación viral), el diagnóstico de enfermedad, predecir la aparición para poder instaurar un tratamiento anticipado, y monitorizar la respuesta al tratamiento antiviral y aparición de recaídas. La PCR cualitativa es muy sensible, pero no puede distinguir entre ADN latente y la replicación del virus activo. Por ello, la PCR cualitativa tiene un papel limitado y algunos centros la utilizan inicialmente, y si resulta positiva, se lleva a cabo la PCR cuantitativa.

En el diagnóstico del síndrome viral, se recomienda determinar la carga viral en sangre porque puede servir entre otras cosas para controlar la eficacia del tratamiento que podría decidir instaurarse. Sin embargo, en el caso del diagnóstico de la enfermedad invasora tisular, se caracteriza por ser dificultosa la interpretación, ya que suele cursar con valores negativos o bajos de carga viral en el caso de afectación gastrointestinal, retinitis o neumonitis en trasplantados pulmonares, siendo el diagnóstico de certeza como se ha comentado en apartados anteriores, la histopatología al igual que un cultivo positivo de la muestra tisular. Además, la detección cualitativa de CMVh mediante PCR en muestras tisulares podría deberse a la presencia del genoma

INTRODUCCIÓN

viral transportado por la sangre o secreciones corporales, por lo que no se deben de emplear en la enfermedad invasora tisular por CMVh ²⁵².

La PCR cuantitativa no están bien estandarizada, ya que las cargas virales varían entre los diferentes pruebas comerciales, y establecer un punto de corte universal depende del ensayo utilizado [volumen de muestra, la técnica de pipeteo, el método de extracción de ácidos nucleicos, el tipo de equipo PCR, la diana amplificada (glicoproteína B, gen de la polimerasa CMV, genes immediate-early, etc), el tipo de sonda (TaqMan, FRET), tipo de primers y los calibradores] ¹⁵², el tipo de muestra (plasma, sangre completa, leucocitos, suero), el órgano trasplantado, el estado serológico del donante y receptor, y el tipo de inmunosupresión. Atendiendo a esta problemática, un estudio internacional multicéntrico comparaba el ensayo comercial COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan CMV con diferentes ensayos de PCR de laboratorio entre 5 centros usando unas muestras determinadas con diferentes soluciones ($2.18-6.7 \log_{10}$ copias/ml) y los estándares desarrollados por la OMS en Noviembre del 2010 donde se pudo observar un alto grado de acuerdo entre ellas ²⁵³⁻²⁵⁵. Previo al desarrollo de este estándar internacional se han publicado numerosos estudios en los que diferentes laboratorios obtenían diferentes resultados de una misma muestra (diferencias en las cargas virales de entre $2-4.3 \log_{10}$ copias/ml) ²⁵⁶.

Diferentes compartimentos de la sangre han sido usados en el diagnóstico de la infección por CMVh incluyendo leucocitos, sangre completa, plasma y suero. Cúal es la muestra adecuada ha sido el tema de debate de diversos estudios, siendo habitualmente la sangre completa y el plasma los tipos de muestra más utilizados. En general, se ha demostrado que la sangre

INTRODUCCIÓN

completa y los leucocitos tienen valores de mayor sensibilidad cuando se comparan con el plasma y suero. El ADN viral es detectado con mayor asiduidad y los valores de carga viral son a menudo más altos en sangre completa que en plasma debido a que los virus son detectados de manera libre e intracelular, estimándose que la carga viral es $1\log_{10}$ superior en sangre completa que en plasma ²⁵⁷. Sin embargo, algunos han sugerido que el usar muestras altamente sensibles podría diagnosticar enfermedad en pacientes con baja carga viral, pero la especificidad de esta prueba no siempre se correlaciona con enfermedad activa por CMVh, porque podría estar detectándose virus latente o viremias transitorias que se resuelven espontáneamente ^{152,257}. En general, la variabilidad de la carga viral es mayor cerca del límite inferior de cuantificación, y hasta que no haya una adecuada estandarización de estas pruebas, es recomendable el uso de la misma técnica y tipo de muestra para monitorizar los pacientes a lo largo del tiempo con el propósito de observar cambios en la carga viral en un mismo laboratorio ²⁵³.

1.8 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

1.8.1 Tratamiento

1.8.1.1 Tratamiento prenatal

A pesar de los avances en el diagnóstico de la infección materno fetal por CMVh, no existe una terapia efectiva disponible. La falta de tratamiento prenatal a menudo conlleva a la interrupción del embarazo, y esta opción es ofertada cuando los fetos infectados o afectados son identificados mediante ultrasonografía o amniocentesis. Recientes estudios se han focalizado en la eficacia de la administración preventiva de inmunoglobulinas CMV o fármacos

INTRODUCCIÓN

antivirales (Valaciclovir) a mujeres embarazadas con infección primaria por CMVh con el fin de reducir la transmisión vertical y mejorar la evolución neonatal.

En el caso de los fármacos antivirales como el valaciclovir, un estudio piloto que incluía 20 mujeres embarazadas con 21 fetos fueron tratadas durante una media de 7 semanas, 10 de ellos tuvieron un desarrollo normal tras 1 a 5 años de seguimiento, 2 niños tuvieron sordera unilateral, 1 neonato presentó microcefalia y sordera severa, 1 feto murió, y 6 de los 7 embarazos que terminaron tuvieron la evidencia de progresión de la enfermedad con empeoramiento de las lesiones cerebrales. La tasa de enfermedad neonatal en mujeres tratadas y no tratadas fue del 52 y 58%, respectivamente ²⁵⁸.

En el caso de las inmunoglobulinas, la terapia con hiperinmunoglobulina en mujeres embarazadas con infección primaria parece prometedora ya que parece reducir la infección sintomática. En tres estudios prospectivos observacionales, la administración de hiperinmunoglobulina CMV específica (Cytotec; Biotest) en mujeres con infección primaria estuvo asociada con una reducción significativa en la transmisión materno-fetal y severidad de la infección congénita ²⁵⁹⁻²⁶¹. Sin embargo, un estudio posterior randomizado no mostró tal beneficio (Congenital Human CMV Infection Prevention; ensayo CHIP). Este incluía a 124 mujeres embarazadas entre las semanas de gestación 5 y 26 con infección primaria por CMVh que recibieron placebo o hiperinmunoglobulina cada 4 semanas hasta la 36 semanas de gestación o detección de CMVh en líquido amniótico. La tasa de infección congénita fue del 30% frente al 44% de aquellas que habían recibido placebo. La proporción de niños infectados sintomáticamente fue del 30% (hiperinmunoglobulina) frente al

24% (placebo). Además, el número de efectos adversos fue superior en aquellas que habían recibido la hiperinmunoglobulina (13% vs 2%). Sin embargo, este estudio no evaluaba la afectación audiológica ²⁶². Todo esto hace que aunque la terapia no sea generalmente recomendada, el uso de la misma debería de ser individualizada informando a las mujeres de los pros y los contras de tal terapia ²⁶³.

1.8.1.2 Tratamiento postnatal

En diversos estudios en los que se incluyen niños con infección sintomática por CMVh, ganciclovir intravenoso (i.v) (6mg/kg cada 12h) fue administrado durante 6 semanas demostrando claros beneficios como una menor frecuencia de hipoacusia cuando se comparaba con aquellos que no habían recibido tratamiento ²⁶⁴. También, en pacientes asintomáticos tratados se ha observado el no desarrollo de hipoacusia frente a los no tratados. Pero aun así con estos resultados, no se recomienda en la actualidad en el tratamiento de los niños asintomáticos porque no se ha demostrado su eficacia y sólo el 7% desarrollará hipoacusia progresiva ¹³⁵.

La administración del profármaco de ganciclovir, valganciclovir (16mg/kg cada 12h), también ha demostrado concentraciones plasmáticas del fármaco comparables con la administración de ganciclovir intravenoso en niños con infección sintomática ²⁶⁵. Pero hasta donde llega nuestro conocimiento, no hay ensayos clínicos randomizados en la infancia.

La duración mínima del tratamiento debe ser 6 semanas, aunque en pacientes con afectación neurológica o hipoacusia debe prolongarse hasta 6 meses ²⁶⁶. Se han descrito hasta la fecha 2 casos de resistencia a ganciclovir y

valganciclovir en niños con infección congénita sintomática, el último de ellos con cepas múltiples resistentes a ganciclovir ^{267,268}.

1.8.1.3 Tratamiento de la infección adquirida

La infección adquirida por CMVh suele resolverse espontáneamente sin necesidad de tratamiento antiviral en la mayoría de los casos. El tratamiento debe ser reservado para los casos más graves de sepsis, neumonitis, hepatitis colestásica, enterocolitis, diarrea o meningoencefalitis, que suelen ser más frecuentes en recién nacidos prematuros de bajo peso. El tratamiento de elección es el ganciclovir i.v (6mg/kg cada 12 h), y otra alternativa es el valganciclovir (16mg/kg cada 12h). La duración del tratamiento debe ser de 2 semanas, evaluando posteriormente la respuesta clínica ¹³⁹.

1.8.1.4 Tratamiento del receptor de trasplante de órgano sólido

El tratamiento más empleado es el valganciclovir oral o ganciclovir intravenoso. Debido a la toxicidad del foscarnet o cidofovir, no son usados como tratamiento de primera línea. Para enfermedad no severa, valganciclovir (900 mg/12h) o ganciclovir i.v (5mg/kg/12h) son el tratamiento de elección. Para enfermedad severa o enfermedad retiniana, se recomienda el ganciclovir iv. Al igual que con la profilaxis, se debe ajustar la dosis con la función renal. La monitorización debe realizarse semanalmente bien con antigenemia pp65 o carga viral. Se han descrito fallos en el tratamiento de carácter clínico o virológico ¹⁹⁹. El desarrollo de resistencia de CMVh a ganciclovir o valganciclovir ha sido documentado en pacientes tratados, fundamentalmente inmunodeprimidos, y está asociado con la emergencia de sustituciones

aminoacídicas en la proteínas virales pUL97, pUL54 o ambas. Se han descrito 40 sustituciones diferentes incluyendo las más frecuentes como M460I/V y C592G en pUL97. Además, se han identificado otras sustituciones que no son plenamente asociadas a ganciclovir/valganciclovir como V466M en pUL97 y E315D en pUL54, las cuales pueden conferir resistencia cruzada con otras terapias empleadas como cidofovir y foscarnet ²⁶⁹.

1.8.2 Prevención

1.8.2.1 Profilaxis en el receptor de trasplante de órgano sólido

Hay 2 estrategias básicas para prevenir la enfermedad por CMVh en el paciente trasplantado: la profilaxis y la terapia anticipada. Existen tres fármacos comúnmente usados tanto para la profilaxis como para la terapia anticipada: ganciclovir i.v, valganciclovir oral y ganciclovir oral. Por lo general, la dosis empleada para la profilaxis universal es la mitad que la usada para la terapia anticipada, y suele ser 900 mg al día. Estas dosis deben ser siempre ajustadas a la función renal. Bajas dosis son asociadas con fallos en el tratamiento y la aparición de cepas resistentes. El valganciclovir es el más usado en la profilaxis sobre todo en trasplante renal. La profilaxis en el trasplante hepático es algo controvertido ya que el valganciclovir está aprobado en Europa y Canadá y no en Estados Unidos. Algunos expertos tienden a usar el ganciclovir i.v en pacientes trasplantados con alto riesgo, como son los pulmonares y cardíacos. La duración de la profilaxis en D+/R- debe ser de 3-6 meses. En el casos D+/R+ ó D-/R+ la profilaxis óptima no está clara, por lo que muchos autores recomiendan un mínimo de 3 meses en trasplante renal, páncreas,

hígado y corazón; sin embargo, esta duración es algo mayor entre 3 y 6 meses en el caso del trasplante pulmonar e intestinal ¹⁹⁹.

1.8.2.2 Prevención de la infección congénita

La prevención como se ha comentado en anteriores apartados se basa fundamentalmente en una buena higiene personal (lavado de manos con agua y jabón, no compartir comida, bebida y utensilios con niños; evitar el contacto con la saliva cuando se besa a un niño, y limpiar todo tipo de objeto en contacto con los niños) ²⁷⁰ y el uso de productos sanguíneos CMVh negativo cuando se realiza alguna transfusión en embarazadas y niños. Los estudios recientes se centran en la inmunización pasiva de la embarazada con inmunoglobulinas ²⁵⁹ y el tratamiento antiviral con valaciclovir ²⁵⁸.

Ninguna vacuna está disponible para el uso de humano, aunque se han desarrollado numerosas vacunas probadas en ensayos clínicos. Los candidatos a vacunas en evaluación clínica incluyen cepas vivas atenuadas, subunidades proteicas, ADN y vectores virales. Las subunidades proteicas se han centrado en las proteínas pp65 y IE1 como potentes inductores de células T citotóxicas y en la glicoproteína B como un potente inductor de anticuerpos neutralizantes. En 2009, Pass y colaboradores publicaron los primeros resultados de un estudio randomizado, doble ciego, placebo controlado en fase 2 de glicoproteína B recombinante con el adyuvante MF59. Esta vacuna tuvo un 50% de eficacia ²⁷¹. Este fue el estudio que dio el pistoletazo de salida al resto de vacunas candidatas. Los recientes estudios sobre las rutas de entrada de CMV dentro de las diferentes células han sugerido una posible fuente de mejora. El complejo pentamérico gH/gL/UL128/UL130/UL131A es el único

INTRODUCCIÓN

requerido para la entrada en las células epiteliales y endoteliales. Los sueros de pacientes infectados contienen anticuerpos con alta capacidad neutralizante específicos para este complejo, mientras que la vacuna gB/MF59 no genera una actividad neutralizante comparable. De hecho, las vacunas de nueva generación en desarrollo preclínico incorporan péptidos, subunidades o complejos multisubunidades que representan partes o todo el complejo pentamérico. Estas aproximaciones incluyen péptidos, proteínas recombinantes, ADN, vectores virales replicodefektivos y viriones inactivados ^{272,273}.

II.JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Justificación

El papel de CMVh como agente etiológico más frecuente de infección congénita a nivel mundial pasa desapercibido, pese a que la infección congénita por CMVh es más frecuente que la mayoría de las enfermedades incluidas en el cribado neonatal en Europa. La falta de concienciación sobre este problema puede explicarse a que la mayoría de las infecciones en la gestante y recién nacidos son asintomáticas, y por tanto no se identifican al nacimiento; las secuelas de la infección congénita por CMVh no se detectan muchas veces al inicio, y la realización de un diagnóstico retrospectivo es más complicado. Además, se ha asumido que las infecciones congénitas por CMVh en madres que presentaban anticuerpos IgG anti-CMVh previamente, no producían patología, lo que ha conducido a la falta de atención de este problema en países donde la seroprevalencia materna es elevada. La frecuencia de la infección y la severidad de las lesiones han hecho que en los últimos años se esté prestando una especial atención al diagnóstico de la transmisión vertical de CMVh. La revisión de la literatura muestra datos contradictorios en la posible asociación entre los diferentes genotipos de CMVh y el desarrollo de cuadros clínicos severos. Uno de los aspectos que ha cobrado mayor interés en los últimos años es la asociación de diferentes genotipos de CMVh con la incidencia y severidad de la infección congénita. Poder encontrar marcadores de virulencia virales nos ayudaría a tomar decisiones terapéuticas y a establecer un pronóstico clínico. Este fue uno de los motivos por el que se puso en marcha este estudio, ya que hasta lo que llega nuestro conocimiento, en España no existe ninguno de este tipo.

2.2 Hipótesis:

El estudio de los diferentes genotipos de las diferentes genes que codifican las proteínas de la envoltura como gB, gH, y el homólogo del receptor del factor de necrosis tumoral UL144, y su correlación con la severidad y curso clínico de la infección, nos ayudarán a establecer qué marcadores de virulencia deben ser monitorizados con fines pronósticos, y a la adecuación de la duración del tratamiento antiviral cuando esté indicado.

2.3 Objetivos:

- 1) Analizar la frecuencia de presentación de los diferentes genotipos de glicoproteínas de la envoltura como glicoproteína B (UL55) y glicoproteína H (UL75), así como del homólogo del receptor del factor de necrosis tumoral UL144 en niños con infección congénita y gestantes con diagnóstico prenatal de infección congénita.
- 2) Comparar la distribución del genotipo de glicoproteína B, glicoproteína H y UL144 en un grupo control de pacientes pediátricos mayores de 2 meses en los que se ha documentado primoinfección por CMVh y en receptores de trasplante de órgano sólido.
- 3) Relacionar los genotipos encontrados de glicoproteína B, glicoproteína H, y UL144 en los pacientes con infección congénita con la severidad de las manifestaciones clínicas.
- 4) Estudiar la asociación entre los genotipos de glicoproteína B, glicoproteína H, y UL144, y la presentación de cargas virales elevadas.

III.MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 TIPO Y ÁMBITO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio retrospectivo observacional caso control realizado en el Hospital 12 de Octubre de Madrid, un hospital universitario, terciario y público, con una población de referencia de 400.000 habitantes y 1.300 camas. El Servicio de Microbiología está dotado de una sección de Virología, la cual es centro de referencia de la Comunidad de Madrid donde llegan muestras procedentes de los diferentes hospitales del Área Sur.

3.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y PERÍODO DE ESTUDIO

Se incluyeron todas las muestras de pacientes remitidas al laboratorio de Virología para el diagnóstico prenatal o postnatal de infección congénita por CMVh en el período comprendido entre Enero de 2002 y Diciembre de 2013. El grupo control estuvo constituido por muestras procedentes de pacientes pediátricos mayores de 2 meses de edad con sospecha de primoinfección por CMVh. Además se estudiaron muestras de sangre periférica provenientes de receptores de trasplante de órgano sólido.

3.3 DEFINICIONES

- **Infección congénita por CMVh:** Aislamiento del virus por cultivo centrifugación en shell-vial (y/o convencional) en orina o saliva durante las dos primeras semanas de vida y/o la detección de ADN de CMVh en líquido amniótico, sangre fetal, sangre de talón, o sangre cordón umbilical (*Criterio microbiológico*).
 - **Infección congénita sintomática por CMVh:** *Criterio microbiológico y ≥ 1 Criterio clínico-analítico-radiológico.*

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Infección congénita asintomática:** *Criterio microbiológico sin Criterio clínico-analítico-radiológico.*
- **Infección adquirida por CMVh:** Aislamiento del virus por cultivo centrifugación shell-vial (y/o convencional) en orina en niños mayores de 2 meses con cultivo de orina.
- **Infección por CMVh o Viremia asintomática en Receptores de TOS:** evidencia de replicación en ausencia de síntomas (difiere de CMVh latente).
- **Enfermedad por CMVh en Receptores de TOS:** evidencia de infección por CMVh con síntomas atribuibles. Se clasificó en **síndrome viral** con fiebre y/o astenia, leucopenia, trombocitopenia, o como **enfermedad tisular** (neumonía, retinitis, enfermedad gastrointestinal).

3.4 PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS

Se recogieron una serie de datos demográficos, clínicos, analíticos, radiológicos y microbiológicos confidencialmente mediante un protocolo de recogida de datos previamente definido (**Anexo I**). Se revisaron las historias clínicas de los pacientes a través del Servicio de Archivo y Documentación, y de la Intranet del Hospital Universitario “12 de Octubre”. En el caso de los Receptores de TOS se recogieron: fecha de nacimiento, sexo, fecha de obtención de la muestra, tipo de muestra, número de muestra, fecha de trasplante, tipo de trasplante, serología, enfermedad, días postransplante, antigenemia y carga viral en plasma y células.

3.5 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La obtención de muestras se realizó de acuerdo al protocolo “Manual de recogida y transporte de muestras al laboratorio de Microbiología” elaborado por el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre. Las muestras enviadas fueron identificadas por parte de los servicios peticionarios y recogidas en las plantas de ingreso o consultas antes de instaurar el tratamiento.

Las muestras de orina, saliva, líquido amniótico y lavado broncoalveolar, se recolectaron en contenedores estériles (**Figura 12AB**). La sangre (periférica y fetal) en tubos con anticoagulante EDTA (BD Vacutainer®) (**Figura 12C**). La sangre de recién nacido fue recogida en las tarjetas de pruebas metabólicas (**Figura 12D**). Una vez recolectadas, las muestras eran enviadas al laboratorio de Virología con o sin medio de transporte UTM (Universal Medium Transport, Copan Diagnostics Inc, USA) (**Figura 12E**), y si no iban a ser procesadas inmediatamente se mantenían en nevera a 4°C. Si no venían acompañadas de medio de transporte, las orinas eran diluidas con medio BME 2% en proporción 1:1, previa centrifugación de la misma si el aspecto era turbio. Posteriormente, todas las muestras, a excepción de la sangre se descontaminaban con gentamicina 80 mg/ml y anfotericina B 250 µg/ml. Las muestras se dejaban 1 hora en la nevera (2-8°C) y una alícuota era congelada a -80°C.

MATERIAL Y MÉTODOS



Figura 12. Medios de transporte para el envío de los diferentes tipos de muestra. De izquierda a derecha y de arriba abajo. A: Frasco estéril orinas. B: Frasco estéril líquido amniótico, lavado broncoalveolar. C: Tubo Vacutainer EDTA. D: Tarjeta de pruebas metabólicas. E: Medio de transporte virus UTM.

Las muestras sanguíneas, líquido amniótico y lavado broncoalveolar, eran procesadas en paralelo al cultivo y/o shell-vial para la detección de ácidos nucleicos mediante PCR. La sangre de recién nacido procedente de las tarjetas de pruebas metabólicas requirieron la extracción de 2-3 círculos mediante bisturí o punzón que se introducían en un tubo eppendorf® con 1 ml de BME 2%, y se dejaron durante 1 día en nevera previa agitación hasta su posterior procesamiento al día siguiente.

3.6 CULTIVO CELULAR CONVENCIONAL

3.6.1 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- Suspensión Fibroblastos MRC-5 30 ml ~ 1.4×10^6 células/ml (Vircell S.L, España)
- Medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (Lonza Biologics S.L, España)
- Medio BME (Basal Medium Eagle) (Lonza Biologics S.L, España)
- Solución antibacteriana de penicilina (50 millones de unidades) y gentamicina (80 mg/ml)
- Solución antifúngica de anfotericina B (250 ug/ml)
- Solución L-Glutamina (200mM) (Lonza Biologics S.L, España)
- Suero bovino fetal (Lonza Biologics S.L, España)
- Solución de tripsina – EDTA (Lonza Biologics S.L, España)
- Solución de azul tripán 0.4% (Sigma-Aldrich Co. LLC, España)
- Solución tampón fosfato salina (PBS) (Vircell S.L, España)
- Solución de formaldehído al 5% (Osgonsa CB, España) y sacarosa al 2% en PBS (FS).

3.6.2 MATERIALES E INSTRUMENTOS

- Pipetas estériles (2, 5, 10, 25ml) (Corning Costar, EE.UU)
- Pipeta automática (Gilson S.A.S, Francia)
- Pipetas Pasteur 1 ml (Afora S.A, España)

MATERIAL Y MÉTODOS

- Tubos cónicos de cultivo celular estériles de 12 ml (Labclinics SA, España)
- Frascos Roux de cultivo de 80 cm² (Fisher Scientific SL, España)
- Cabina de flujo laminar
- Estufas de cultivo de 37°C (Raypa S.L, España)
- Microscopio óptico invertido (Olympus Iberia S.A.U, España)
- Cámara hematocimétrica Neubauer (Brand, Alemania)
- Microscopio de fluorescencia (Nikon S.A., España)
- Cámara húmeda

3.6.3 PROCEDIMIENTO

3.6.3.1 Preparación de las células

- Tripsinizar las células, añadiendo 2-3 ml de solución de tripsina al frasco que contiene la monocapa del cultivo celular.
- Cuando las células empiecen a desprenderse, parar la tripsinización añadiendo 5-10 ml de MEM 10%.
- Contar las células viables en cámara de Neubauer con azul tripán (serán viables las que no permiten la entrada del colorante).
- Ajustar la suspensión a 100.000 células/ml, añadiendo medio de crecimiento MEM 10%.
- Repartir la suspensión ya ajustada en los tubos de cultivo celular de 12 ml, a razón de 1.5-2 ml.
- Incubar los tubos hasta que se forme una monocapa en la parte inferior del tubo.

3.6.3.2 Inoculación de los cultivos celulares

- Identificar los tubos con el número de muestra correspondiente y fecha.
- Añadir 200 µl o 4 gotas de la muestra con pipeta estéril.
- Incubar a 37°C durante 1 hora.
- Decantar la muestra, y añadir 1.5 ml de medio de mantenimiento (BME 2%).
- Incubar a 37°C.
- Retirar y cambiar de nuevo el medio de mantenimiento BME 2% (1.5 ml) cada 24-48 horas.
- Observar diariamente el efecto citopático en fibroblastos MRC-5 mediante el microscopio óptico invertido.
- Si a los 15 días no aparece el efecto citopático, se debe considerar el resultado del cultivo como negativo.

3.7 CULTIVO SHELL-VIAL (CENTRIFUGACIÓN)

3.7.1 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- Viales de plástico de fondo plano (16 x 50) (Tec-Laim S.A, España) con tapón con una monocapa de fibroblastos MRC-5 formada sobre un cubreobjetos redondo de 12 mm previamente preparada (al menos 72 horas antes) a razón de 50.000 células/ml.
- Medio EMEM (Lonza Biologics S.L, España)
- Suero bovino fetal (Lonza Biologics S.L, España)
- Solución antibacteriana de penicilina (50 millones de unidades) y gentamicina (80 mg/ml)
- Solución antifúngica de anfotericina B (250 ug/ml)

MATERIAL Y MÉTODOS

- Solución L-Glutamina (200mM) (Lonza Biologics S.L, España)
- Tampón fosfato salino (PBS) PH=7.2 (Vircell S.L, España)
- Metanol absoluto 99.8% V/V(Applichem Panreac S.L.U, España)
- Azul de Evans al 1:50.000 en PBS
- Anticuerpos monoclonales contra la proteína 72 KD de CMV (antígenos immediate early) (Innogenetics)
- Solución de glicerina buferizada o tamponada pH=8

3.7.2 MATERIALES E INSTRUMENTOS

- Pipetas Pasteur 1 ml (Afora S.A, España)
- Agujas
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Cámara húmeda
- Cabina de flujo laminar
- Centrífuga (Eppendorf, Alemania)
- Estufa de cultivo de 37°C (Raypa S.L, España)
- Cámara hematocimétrica tipo Neubauer (Brand, Alemania)
- Pipetas automáticas (Gilson S.A.S, France)
- Microscopio de fluorescencia (Nikon S.A, España)

3.7.3 PROCEDIMIENTO

- Identificar los viales con el número de muestra correspondiente y fecha.
- Eliminar mediante aspiración el medio MEM 10%.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Inocular 200 µl de muestra en cada vial directamente sobre la monocapa celular.
- Centrifugar a 453 g (1500 rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 1-2 ml de medio de mantenimiento BME 2% e incubar a 37°C durante 24-48 horas.
- Para fijar los viales, tras la incubación, aspirar el medio de cultivo.
- Lavar con 1 ml de PBS PH=7.2 y dejar durante 15 segundos y aspirar, repetir el proceso 2 veces más.
- Añadir 1 ml de metanol absoluto y mantenerlo durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Aspirar el metanol y lavar con PBS tres veces.
- Añadir 100 µl de anticuerpo monoclonal.
- Incubar los viales a 37°C durante 45 minutos.
- Aspirar y lavar con 1 ml de PBS cada vial. Repetir el paso tres veces.
- Añadir 1 gota de conjugado.
- Incubar los viales a 37°C durante 30 minutos.
- Lavar con 1 ml de PBS cada vial. Repetir el paso tres veces.
- Con la ayuda de una aguja y pinza estéril, sacar los cubreobjetos que contienen la monocapa del interior del vial.
- Dejar secar los cubreobjetos a temperatura ambiente procurando no dañar la monocapa.
- En un portaobjetos convencional rotulado con los correspondientes números de muestra, poner una gota de aceite de montaje, colocar los cubreobjetos sobre las gotas depositadas y dejar que sequen bien.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Observar las preparaciones en el microscopio de fluorescencia. Se considera positiva si se observa al menos un núcleo de fibroblasto con fluorescencia verde y morfología ovalada característica (**Figura 13**)

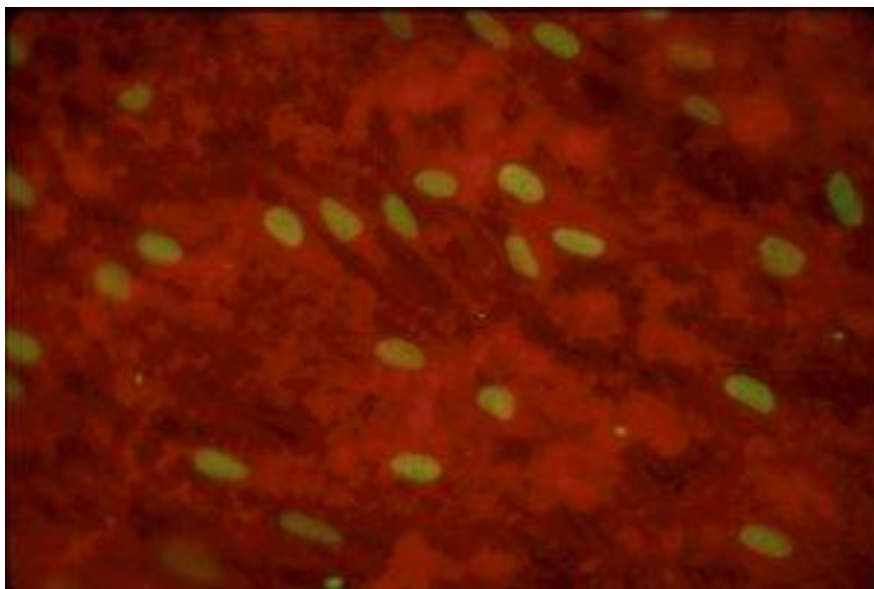


Figura 13. Observación mediante microscopio de fluorescencia de un cultivo shell-vial de células MRC-5 infectadas con CMVh.

3.8 PRUEBA DE ANTIGENEMIA

3.8.1 REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

- Solución HES Hipertónico (Movaco-Grifols S.A, España)
- Tampón fosfato salino (PBS) PH=7.2 (Vircell S.L, España)
- Red Blood Cell Lysis Buffer (RBC) (Cloruro amónico al 0.8%P/V en agua destilada) (Sigma-Aldrich Co. LLC, España)
- Solución de formaldehído 5% - sacarosa 2% en PBS (Osgansa S.A, España) (25 ml de formaldehído, 175 ml de PBS, 10 gramos de sacarosa)
- Solución Igepal (Sigma-Aldrich Co. LLC, España)

MATERIAL Y MÉTODOS

- Monofluo® Kit CMV (Bio-Rad Laboratories, Francia): Anticuerpo monoclonal murino antipp65 y anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína
- Solución de glicerina buferizada o tamponada pH=8.
- Cabina de flujo laminar
- Centrífuga (Eppendorf, Alemania)
- Cámara hematocimétrica tipo Neubauer (Brand, Alemania)
- Agitador tipo vórtex (Tec-Laim S.A, España)
- Tubos de estériles de plástico de 10 ml de fondo cónico con tapón de rosca (Labclinics SA, España)
- Pipetas Pasteur 1 ml (Afora S.A, España)
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Cámara húmeda
- Pipetas automáticas (Gilson S.A.S, France)
- Microscopio de fluorescencia (Nikon S.A, España)
- Microscopio óptico invertido (Olympus Iberia S.A.U, España)

3.8.2 PROCEDIMIENTO

1. En una cabina de flujo laminar y con puntas estériles, se toman 4 ml de sangre completa anticoagulada con EDTA y se trasvasan a un tubo cónico estéril de 10 ml.
2. Mezclar los 4 ml de sangre total con 1 ml de HES con pipeta estéril. Dejar sedimentar los eritrocitos en posición vertical durante 1 hora. Lo

MATERIAL Y MÉTODOS

más importante es que el sobrenadante quede lo más libre de eritrocitos que se pueda.

3. Recoger el sobrenadante (plasma y leucocitos) y pasarlo a otro tubo estéril.
4. Centrifugar a 453g (1500 rpm) durante 5 min a temperatura ambiente. Aspirar el sobrenadante.
5. El botón obtenido contiene eritrocitos, por lo tanto se añaden 2 ml de RBC. Homogeneizar y dejar en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos.
6. Centrifugar a 453g (1500 rpm) durante 5 min. Aspirar el sobrenadante y nos quedamos con el botón.
7. Resuspender el botón con agua destilada, hacer recuento en cámara de Neubauer, y aplicar la siguiente fórmula con el objetivo de conseguir una concentración de 200.000 células/ μ l.

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ células} \times 2 \times 16 \times 10^4 \times \text{dilución}}{200.000 \text{ células}} \times 25$$

8. Agregar 25 μ l en los pocillos del portaobjetos previamente identificados
9. Dejar secar a temperatura ambiente.
10. Añadir una solución de formaldehído 5% - sacarosa 2% y dejar durante 10 minutos. Este paso sirve para la fijación de la muestra.
11. Lavar tres veces con PBS.
12. Añadir Igepal para permeabilizar la membrana celular.
13. Lavar tres veces con PBS.
14. Agregar una gota del anticuerpo monoclonal murino anti-pp65 en cada uno de los pocillos que contienen la muestra y a dos pocillos en los que

MATERIAL Y MÉTODOS

se han añadido los controles positivo y negativo que proporciona el kit comercial, incubar a 37°C durante 30 minutos. Colocar el portaobjetos dentro de una cámara húmeda.

15. Lavar tres veces con PBS y dejar secar pero no completamente.
16. Agregar una gota del conjugado fluoresceínado (anticuerpo antiratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína) a todos los pocillos e incubar a 37°C durante 30 minutos. Colocar el portaobjetos dentro de una cámara húmeda.
17. Lavar tres veces con PBS y dejar secar completamente.
18. Agregar una gota de glicerina buferizada (aceite de montaje) y colocar el cubreobjetos.
19. Leer en el microscopio de fluorescencia. La reacción se considera positiva si se observa un núcleo con fluorescencia con morfología de característica de leucocito polimorfonuclear. Contabilizar el número de células positivas y referir la cifra sobre 100.000 leucocitos totales. La reacción se considera negativa si no se observa fluorescencia y todas las células se ven de color rojo (**Figura 14**).

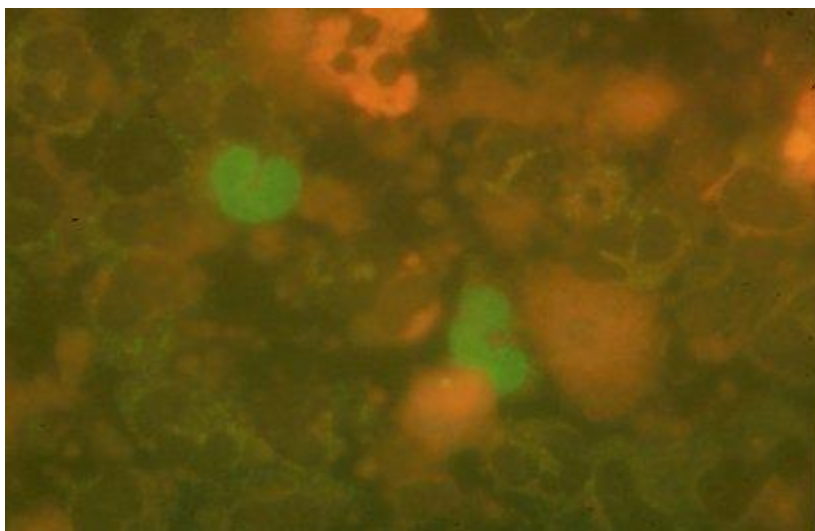


Figura 14. Observación mediante microscopio invertido de una prueba de antigenemia pp65.

3.9 PCR EN TIEMPO REAL

3.9.1 MEDIDAS DE SEGURIDAD

En el laboratorio existen cuatro áreas de trabajo bien diferenciadas para evitar la contaminación de las muestras con el producto amplificado, que es uno de los principales inconvenientes de la técnica de PCR: a) zona de extracción de ácidos nucleicos, inoculación de las muestras, lectura de cultivo celular convencional, b) zona pre-PCR (preparación de la mezcla de los reactivos, preparación de los cultivos celulares), c) zona de amplificación PCR (equipos de PCR convencional y en tiempo real), d) zona post-PCR (electroforesis y secuenciación) (**Figura 15**).

MATERIAL Y MÉTODOS



Figura 15. Laboratorio de Virología del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario 12 de Octubre. De izquierda a derecha. De arriba y abajo. A: Zona de extracción de ácidos nucleicos, inoculación y lectura de los cultivos celulares. B: Zona pre-PCR (preparación de la mezcla de los reactivos, preparación de los cultivos celulares). C: Zona de amplificación PCR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Además de esta organización, se adoptaron otro tipo de medidas como la utilización de guantes y batas desechables en todo momento cambiándolos con cierta frecuencia y obligatoriamente cada vez que se empezaba a trabajar en las áreas previamente descritas, limpieza de la zona de trabajo mediante alcohol al 70%, lejía diluida al 10% y luz ultravioleta al menos 20 minutos, y material de trabajo propio en cada una de las zonas de trabajo.

3.9.2 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La extracción de ácidos nucleicos se realizó mediante el uso del sistema semiautomatizado comercial NucliSENS® easyMag (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia) atendiendo a las instrucciones del fabricante (volumen de muestra 200 µl y volumen de elución 50 µl) (**Figura 16**). Es un método de extracción magnético basado en la tecnología de extracción con partículas de sílice las cuales presentan la capacidad de unirse al ADN y ARN en presencia de altas concentraciones de sal.



Figura 16. Sistema semiautomático de extracción NucliSENS® easyMag

MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez finalizada la extracción, se recogió el eluido en tubos eppendorf de 1.5 ml previamente rotulados con el número, tipo de muestra, y fecha. Si no se utilizaron directamente para la amplificación se almacenaron a -80°C.

3.9.3 PCR EN TIEMPO REAL

Mediante PCR a tiempo real se detectó la presencia de CMVh en los distintos tipos de muestra. Además se amplificó un fragmento de la β -2 microglobulina como control interno (**Tabla 7**) para detectar la presencia de inhibidores de PCR en la muestra.

3.9.3.1 REACTIVOS

- Cloruro de magnesio a concentración 25mM (Roche Diagnostics)
- Mezcla de reacción Light®Cycler Fast Start DNA Master Hybprobe 10x : *Taq* polimerasa, buffer de reacción, dNTPs y Cloruro de Magnesio 10Mm (Roche Diagnostics)
- Uracil N-glicosilasa a concentración 1U/ μ l (Roche Diagnostics)
- Agua libre de nucleasas (Roche Diagnostics)
- Primers a una concentración de 10 μ M (**Tabla 7**)

3.9.3.2 MATERIAL E INSTRUMENTOS

- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml (Eppendorf, Alemania)
- Microcentrífuga
- Cabina de flujo laminar
- Centrífuga (Eppendorf, Alemania)
- Agitador tipo vórtex (Tec-Laim S.A, España)

MATERIAL Y MÉTODOS

- Puntas de pipeta ART™ con filtro estériles (Promega Biotech Ibérica S.L, España)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics S.L, España)
- LightCycler® 480 SYBR Green I o Probes Master (Roche Diagnostics S.L, España)
- LightCycler® 480 High Resolution Melting (Roche Diagnostics S.L, España)
- Equipo LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics S.L, España)
- Placas de 96 pocillos LightCycler® 480 Instrument II (Roche Diagnostics S.L, España)
- Adaptadores LightCycler® para capilares (Roche Diagnostics S.L, España)
- Centrífuga LightCycler® para Capilares 2.0 (Roche Diagnostics S.L, España)
- Capilares LightCycler® de 20 µl (Roche Diagnostics S.L, España)

3.9.3.3 PCR CUALITATIVA (SANGRE FETAL, LIQUIDO AMNIOTICO, SANGRE DE TARJETAS DE PRUEBAS METABÓLICAS)

La PCR en tiempo real se realizó en el LightCycler® Instrument Versión

2.0.

3.9.3.3.1.Mezcla de reacción (Volumen final = 20µl)

	Volumen (µl)	Concentración final (µM)
Master Hybridation	2	1x
Primer F (Tabla 7)	1	0.5
Primer R (Tabla 7)	1	0.5
Sonda	0.4	0.2
MgCl ₂	2	3.75 mM
UNG	1	1U
Agua	7.6	
Eluido de muestra	5	

MATERIAL Y MÉTODOS

Además, se añadieron control interno (β 2-microglobulina), control positivo (AD169) y control negativo (agua).

3.9.3.3.2 Condiciones de amplificación

El ciclo de amplificación programado de la PCR cualitativa fue:

Nº Ciclos	Etapas	Temperatura	Tiempo
	Activación UNG	15-25°C	10 min
1	Desnaturalización	95°C	10 min
50	Desnaturalización	95°C	15 seg
50	Annealing y extensión	60°C	60 seg
1	Enfriamiento	40°C	30 seg

3.9.3.4 PCR CUANTITATIVA (SANGRE COMPLETA, SANGRE FETAL, LIQUIDO AMNIOTICO, SANGRE DE TARJETAS DE PRUEBAS METABÓLICAS)

La PCR en tiempo real se realizó en el LightCycler® Instrument Versión 2.0 o LightCycler® 480 II.

3.9.3.4.1 Mezcla de reacción (Volumen final = 25 μ l)

La PCR fue realizada mediante el kit CMV R-gene™ el cual incluye entre otros reactivos: control interno (IC2), estándares de cuantificación (QS1, QS2, QS3, y QS4), control de sensibilidad (SC=1 copia/ μ l), mezcla de amplificación (R5) y H₂O para la amplificación.

Volumen (μ l)	
Mezcla de amplificación	15
Eluido de muestra	10

Estándar	Copias/ml
QS4	1250
QS3	12500
QS2	125000
QS1	1250000

MATERIAL Y MÉTODOS

Además, se añadieron los estándares de cuantificación, control de sensibilidad, control interno, control positivo (AD169) y control negativo (agua).

3.9.3.4.2 Condiciones de amplificación para ambos instrumentos

El ciclo de amplificación programado de la PCR cuantitativa fue:

Nº Ciclos	Etapas	Temperatura	Tiempo
	Activación UNG	15-25°C	10 min
1	Desnaturalización	95°C	15 min
45	Desnaturalización	95°C	10 seg
45	Annealing y extensión	60°C	40 seg
1	Enfriamiento	40°C	30 seg

3.9.3.5 GENOTIPADO DE CITOMEGALOVIRUS

La PCR en tiempo real se realizó en el equipo LightCycler® 2.0 o LightCycler® 480 II .

3.9.3.5.1 Genotipado de glicoproteína B y glicoproteína H

Mezcla de reacción glicoproteína B y glicoproteína H (Volumen final = 25 µl)

Glicoproteína B	Volumen	Concentración final
PCR múltiple	(µl)	(µM)
Master Hybridation Probes	2.5	1x
Primer F (Tabla 7)	0.75	0.3
Primer R (Tabla 7)	0.75	0.3
Sonda	0.5	0.2
MgCl ₂	3	4 mM
UNG	1	1U
Agua	2	
Eluido de muestra	10	

MATERIAL Y MÉTODOS

Glicoproteína H	Volumen	Concentración final
PCR múltiple	(μ l)	(μ M)
Master Hybridation Probes	2.5	1x
Primer F (Tabla 7)	0.75	0.3
Primer R (Tabla 7)	0.75	0.3
Sonda	0.5	0.2
MgCl ₂	3	4 mM
UNG	1	1U
Agua	4.5	
Eluido de muestra	10	

Además, se añadieron control interno, control positivo (AD169) y control negativo (agua).

Condiciones de amplificación

El ciclo de amplificación programado del genotipado de glicoproteína B y glicoproteína H fue:

Nº Ciclos	Etapas	Temperatura	Tiempo
	Activación UNG	15-25°C	10 min
1	Desnaturalización	95°C	10 min
45	Desnaturalización	95°C	10 seg
	Annealing	55°C	15 seg
	Extensión	72°C	30 seg
1	Enfriamiento	40°C	30 seg

3.9.3.5.2 Genotipado de UL144

Mezcla de reacción del genotipado de UL144 (Volumen final = 20 µl)

UL144 PCR	Volumen (µl)	Concentración final (µM)
Master Hybridation	2	1x
Primer F (Tabla 7)	1	0.5
Primer R (Tabla 7)	1	0.5
MgCl ₂	0.8	2mM
UNG	1	1U
Agua	9.2	
Eluido de la muestra	5	

Además, se añadieron control interno, control positivo y control negativo (agua).

Condiciones de amplificación

El ciclo de amplificación programado del genotipado de UL144 fue:

Nº Ciclos	Etapas	Temperatura	Tiempo
	Activación UNG	15-25°C	10 min
1	Preincubación	95°C	5 min
40	Desnaturalización	95°C	10 seg
	Annealing	55°C	30 seg
	Extensión	72°C	1 min
1	High Resolution Melting	95°C	1 min
		40°C	1 min
		70°C	1 seg
		95°C	0 seg
1	Enfriamiento	40°C	30 seg

Asignación de los genotipos de UL144 atendiendo a los diferentes perfiles de temperaturas de melting observados

Cuando se llevó a cabo la realización del genotipado de UL144, se pudo observar que las muestras se agrupaban en diferentes temperaturas de melting. Dos muestras representativas de cada grupo fueron secuenciadas posteriormente para poder asignar el correspondiente genotipo (Apartado 3.10).

Genotipos	Temperaturas de Melting °C
	(Media \pm DE)
UL144 A	84,66 (\pm 0,17)
UL144 B	83,73 (\pm 0,25)
UL144 C	85,14 (\pm 0,15)
UL144 A/C	85,73 (\pm 0,23)
UL144 A/B	84,93

3.10 SECUENCIACION UL144

Los productos de amplificación obtenidos mediante PCR fueron secuenciados mediante ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EEUU).



Figura 17. Imagen del secuenciador ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer

3.10.1 Purificación

Para ello primero, se procedió a purificar los productos de la PCR seleccionados con el reactivo ExoSAP-IT (Affymetrix) siguiendo las siguientes instrucciones:

- Por cada 5 µl de producto amplificado, se añadieron 2 µl de ExoSAP-IT.
- Mezclar e incubar a 37°C durante 15 minutos en un termociclador.
- Inactivar la ExoSAP-IT mediante calentamiento a 80°C durante 15 minutos.

3.10.2 Reacción de secuenciación

Para el gen UL144 se llevaron a cabo dos reacciones de secuenciación, una para cada hebra de ADN, empleando para ello el iniciador 3'-5' en una de las reacciones y el iniciador 5'-3' en la otra. Las reacciones de secuenciación de los productos de PCR purificados se realizaron en un volumen final de 10 µl, añadiendo 2,5 µl del reactivo BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EEUU) y 1 µl de cebadores (4 µM) (**Tabla 7**). La cantidad del producto de PCR se añadió en función de la concentración de ADN (siempre que no superara los 90 ng/µl) del mismo, que se midió con un espectrofotómetro modelo Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech). La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf (Eppendorf, Alemania) con las siguientes condiciones:

1. Desnaturalización 96°C durante 1 minuto,

MATERIAL Y MÉTODOS

2. 25 ciclos de desnaturalización 96°C durante 10 segundos, annealing 50° durante 5 segundos, y extensión 60°C durante 4 minutos.
3. Enfriamiento a 4°C.

3.10.3 Precipitación

Para evitar que ciertos componentes de la reacción (terminadores dye) pudieran interferir en la correcta asignación de bases, se procedió a purificar el producto de la reacción de secuenciación mediante el método manual de precipitación con etanol siguiendo el siguiente protocolo:

- Añadir al producto secuenciado 2 µl de acetato sódico 3 M (pH 4,6) y 50 µl de etanol al 100%.
- Agitar y centrifugar a 2000g durante 20 minutos.
- Decantar el sobrenadante, y volver a centrifugar con la placa invertida durante 1 minuto a 150g para eliminar bien el sobrenadante.
- Añadir 150µl de etanol al 70% en cada uno de los pocillos de la reacción, y centrifugar la placa a 2000g durante 5 minutos.
- Decantar el sobrenadante y centrifugar a 150g durante un minuto. Ya tendremos el producto purificado en la placa.

Las secuencias purificadas se resuspendieron en 20 µl de formamida que tras agitar la placa del orden de 10 a 15 segundos se centrifugaron durante 30-40 segundos a 2000g para su posterior secuenciación automática mediante el

secuenciador ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EEUU).

3.10.4 Análisis de las secuencias e interpretación de los resultados

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y ensambladas mediante la herramienta informática programa Geneious (Invitrogen, EEUU). La asignación de genotipos se realizó mediante la comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos del Genbank.

3.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las variables demográficas, clínicas y microbiológicas fueron recogidas en una base de datos con el programa Microsoft Excell para Windows. Los datos se analizaron con el programa informático SPSS versión 17.0 (SPSS, Chicago, EEUU), Epi Info™ versión 3.5.4 (CDC; Atlanta, EEUU) y Epidat 3.0 (Pan American Health Organization). Se realizó la estadística descriptiva de las variables recogidas. Las variables cuantitativas se expresaron con media y desviación estándar (DE) y/o mediana y rango intercuartílico (RI). Las variables categóricas se expresaron con su frecuencia. Las variables cualitativas categóricas fueron analizadas mediante la prueba de χ^2 y si alguna de las frecuencias esperadas era menor de 5 se utilizó la de prueba de Fisher. Las variables cuantitativas continuas se compararon mediante el prueba de t Student o mediante pruebas no paramétricas como el U prueba de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis cuando se vulneraba el supuesto de normalidad. La asociación entre una variable cuantitativa y una categórica fue llevada a cabo mediante prueba de t de Student, cuando era dicotómica, sin embargo cuando está presentaba tres o más categorías se realizó a través de

MATERIAL Y MÉTODOS

un modelo matemático más general como el Análisis de la varianza (ANOVA). Si no cumplían los requisitos de distribución normal y homogeneidad de varianzas se recurrió a pruebas no paramétricas como la prueba Kruskal-Wallis. Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando el valor de p era $<0,05$.

Tabla 7. Primers y sondas utilizados en las PCR realizadas en el estudio

VIRUS	DIANA	TAMAÑO AMPLICON (pb)	SECUENCIA OLIGONUCLEOTÍDICA (5'-3')	REFERENCIA
CMV PCR cualitativa	Proteína MIE	76	F: AAC TCA GCC TTC CCT AAG ACC A R: CAA TGG CTG CAG TCA GGC CAT GG S: GGG AGC ACT GAG GCA AGT TC	[274]
CMV PCR cuantitativa	Proteína estructural pp65 (ppUL83)	No disponible	No disponible	Argene
CMV Glicoproteína B	Glicoproteína B1	93	F: TCA CCA TTC CTC TCR TAC GAC R: CAC CAT GGC TGA CCG TTT GG S: FAM-TCT GCT GCT CAY TCT CGA TCC GGT TC-BHQ-1	[275]
	Glicoproteína B2	152	F: CTT TAA GGT ACG GGT CTA CCA A R: GAA CTG TAG CAT TGG GCA AAC T S: YAK-CTA CGC TTA CAT CYA CAC CAC TTA TCT GC-BHQ-1	[275]
	Glicoproteína B3	73	F: CCG GTG TGA ACT CCA CGC G R: GAT TCG CTT TCA RGY GAC AGG S: TXR-TCG TAT TGC CCG TAC T-BHQ-2	[275]
	Glicoproteína B4	85	F: TCG TGC AAC TTC TAC TCA TAA TG R: CGT TAC GCG TTG AGA GGA GAT S A: Q705-AAA CCA TAC TTC TCA TAC GAC GTC TGC TC-BHQ-2 S B: Q705-AAG CCA TAT TTC TCG TAC AAC GTC TGC TC-BHQ-2	[275]
CMV Glicoproteína H	Glicoproteína H1	181	F: GAG ACT TAA CAC CTA CGC AT R: CGA TCC CTT CCA GTC G S: FAM-GGG TCA GCA GCC CAC CAC C-BHQ-1	[275]
	Glicoproteína H2	134	F: TGG ACA CGA TCT ACT ATT CA R: TGT CGT CGT CTA TGG AC S: YAK-CAC CGT CAC ACC TTG TTT GCA CC-BHQ-1	[275]
CMV UL144	UL144	737	F: TCGTATTACAAACCGGAGAGGAT R: ACTCAGACACCGTTCCGTAA	[51]
	UL144	399	F: GCCTCTGATAATGCTCATCTGC R: GGCTAGAGTATGACGACCGCTT	[51]
Control interno	β2-Microglobulina-ADN	105	F: TGA GTA TGC CTG CCG TGT GA R: CCA TGT GAC TTT GTC ACA GCC CAA GAT AGT T S: FAM- ACT CAT ACA CAA CTT TCA GCA GCT TAC- TAMRA	[274]

IV.RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 MUESTRAS CLINICAS ANALIZADAS POR TIPO DE PACIENTE

Durante el período de estudio 2002-2013, se incluyeron 56 pacientes con sospecha de infección congénita, 39 niños y 17 embarazadas. Se evaluaron un total de 70 muestras procedentes de 39 niños, de los cuales 21 aportaron más de 2 muestras al estudio. Estas muestras fueron 55 orinas, 11 sangres (4 sangres periféricas, 7 sangres de talón), 2 salivas, y 2 exudados faríngeos. El número de muestras procedentes de las 17 mujeres con diagnóstico prenatal de infección congénita fueron 18, 10 sangres fetales y 8 líquidos amnióticos. Las muestras eran remitidas de diferentes servicios peticionarios: 33.9% Hospitales Externos (Hospital Universitario de Fuenlabrada, Hospital Universitario Severo Ochoa, Hospital Universitario de Móstoles, Hospital Universitario de Getafe), 30.3% Obstetricia y Ginecología, 21.4% Neonatología, 12.5% Pediatría, y 1.8% Otorrinolaringología infantil. La distribución anual y estacional de las muestras remitidas al laboratorio de virología se encuentra representada en la **Figura 18**.

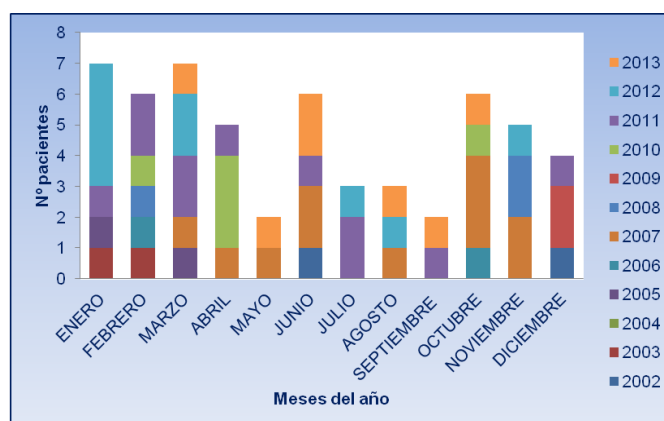


Figura 38. Distribución estacional de las muestras de infección congénita remitidas al laboratorio de virología durante los años 2002-2013

La **Figura 18** señala un aumento de las muestras enviadas en los últimos 3 años (2011-2013) representando el 48.2% y existiendo un repunte fuera de dicho período en el año 2007 (19.6%). Se recibieron muestras a lo largo de todos los meses, siendo los meses de otoño e invierno donde se concentraron la mayor parte de las muestras (62.5%), junto con Junio.

El grupo de infección adquirida estuvo constituido por 40 pacientes con sospecha de primoinfección por CMVh. Estas muestras fueron 35 orinas, 2 aspirados nasofaríngeos, 1 exudado bronquial, 1 lavado broncoalveolar y 1 sangre periférica. Las muestras procedieron de diferentes servicios: Pediatría (77.5%), Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (12.5%) y Neonatología (10%).

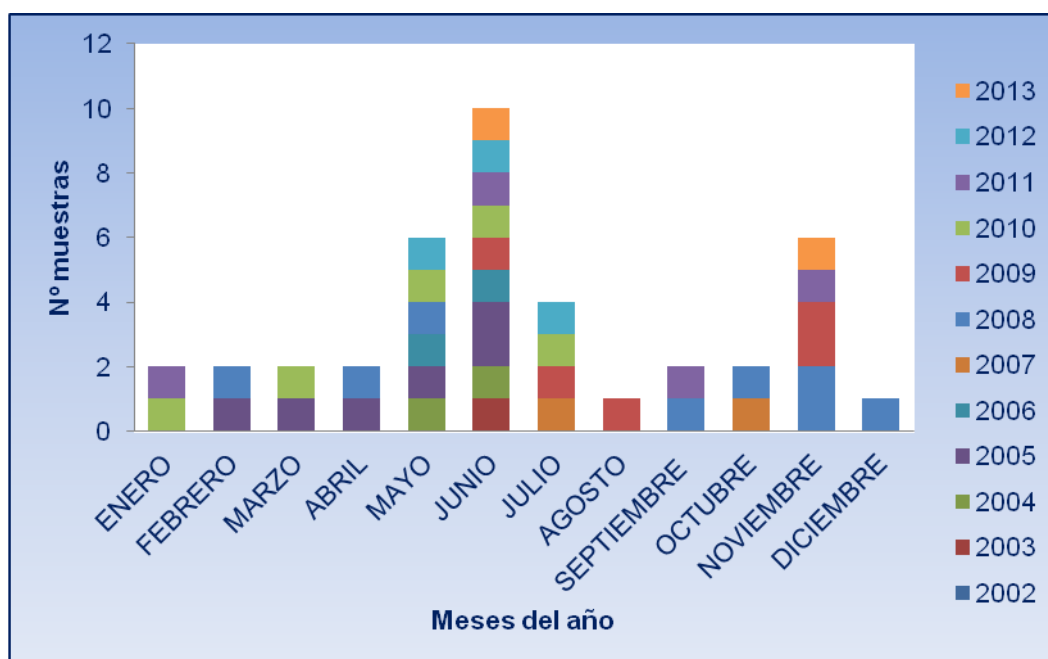


Figura 19. Distribución estacional de las muestras de infección adquirida remitidas al laboratorio de virología durante los años 2002-2013

La **Figura 19** señala un aumento de las muestras enviadas en el período comprendido entre los años 2008-2011 representando el 45% y existiendo un repunte fuera de dicho período en los años 2004-2006 (25%). Las muestras fueron remitidas a lo largo de todos los meses, siendo los meses de Mayo, Junio y Noviembre los que concentraron la mayor parte de las muestras (55%).

Además, durante los años 2004-2005, 162 muestras de células mononucleares de sangre periférica obtenidas a lo largo del seguimiento rutinario de 62 pacientes receptores de trasplante de órgano sólido (33 Renal, 10 cardíaco, 19 hepático), fueron incluidas. La petición fue realizada por las unidades de trasplante correspondientes.

4.2 DATOS CLINICOS

4.2.1 NIÑOS CON INFECCIÓN CONGÉNITA

Durante el período de estudio, se incluyeron 39 niños de los que el 56.4% fueron hembras y el 43.6% varones. La mediana [Rango intercuartílico (RI)] de edad a la cual se llevó a cabo el diagnóstico de infección congénita fue de 9 [3 – 39,5] días. Treinta y tres (84.6%) eran de raza blanca y los otros 6 (15.4%) restantes eran latinoamericanos. La detección de anticuerpos IgG e IgM anti-CMVh se llevó a cabo en el 28.2% de los pacientes. El 69.2% (27/39) de los niños fueron sintomáticos, el 15.4% (6/39) asintomáticos, y en el otro 15.4% (6/39) restante se ignoraba el nivel de afectación clínica, por lo que se excluyeron del análisis estadístico realizado entre los diferentes genotipos y las variables clínicas estudiadas, pero no en el estudio de la distribución de los genotipos. Se observó retraso en el crecimiento uterino en las ecografías

realizadas durante el embarazo en el 23.1%. El 5.1% (2/39) mostró hepatoesplenomegalia y el 7.7% (3/39) rash petequial. Valganciclovir fue instaurado en 8 pacientes (20.5%), Ganciclovir en 2 (5.1%), una combinación de primero Ganciclovir y luego Valganciclovir en 5 (12.8%) de ellos. Los parámetros analíticos disponibles vienen reflejados en la **Tabla 8**.

Parámetro (unidades)	N	Media (Desviación Estándar)	Mediana (Rango Intercuartílico)	Valores de referencia
Leucocitos (x 1000/ μ l)	22	11.74 (\pm 55.03)	11.13 [8.32 ; 12.98]	[3.50 - 12.98]
Hematíes (x 10 ⁶ / μ l)	22	4.06 (\pm 0.83)	3.98 [3.58 ; 4.50]	[4.00- 5.50]
Hemoglobina (g/dl)	22	14.54 (\pm 3.29)	14.5 [11.8 ; 17]	[11.3 - 14.7]
Plaquetas (x 1000/ μ l)	22	243.72 (\pm 155.29)	208.0 [144.25 ; 263.50]	[186 - 412]
Enzimas hepáticas				
GPT (U/l)	22	24.54 (\pm 18.34)	19 [13 ; 29]	[5 -57]
GOT (U/l)	22	64.7 (\pm 62.1)	50.5 [41.75 ; 62.25]	[5 -89]
GGT (U/l)	22	165.80 (\pm 151.46)	157 [68 ; 205]	[10 - 185]
Bilirrubina total (mg/dl)	20	4.54 (\pm 4.53)	3.15 [1.02 ; 6.77]	[0.2 - 1.0]
Bilirrubina directa (mg/dl)	9	1.0 (\pm 0.62)	0.98 [0.62 ; 1.33]	[0.01 - 0.50]
Albúmina (g/dl)	13	3.93 (\pm 0.95)	3.8 [3.4 ; 4.06]	[3.8 - 5.4]
Proteína C- Reactiva (mg/dl)	7	7.65 (\pm 12.61)	1.4 [1.08 ; 7.35]	[0.00 - 0,05]

Los diferentes parámetros analíticos se encontraron dentro del rango de la normalidad, a excepción de la bilirrubina total, bilirrubina directa y proteína C-reactiva, cuyas medias y/o medianas se mostraron elevadas. Cinco (12.8%) pacientes presentaron leucocitosis, 11 (28.2%) bajo recuento de hematíes, 4 (10.2%) anemia, 9 (23.1%) plaquetopenia, 3 (7.7%) trombocitosis, 15 (38.4%) ictericia, y 9 (23.1%) de ellos tenían alterada alguna de las enzimas hepáticas, estando GGT elevada en 6 (15.4%) casos.

En más de la mitad de los pacientes (71.8%) hubo constancia de la realización de al menos una ecografía cerebral, exceptuando a 2 (5.1%) pacientes en los que se realizó resonancia magnética cerebral (RMN) como única prueba. Se llevó a cabo la RMN como prueba asociada a la ecografía en 12 pacientes, y a 9 (23.07%) pacientes no se les realizó ningún estudio de imagen. Los hallazgos ultrasonográficos obtenidos mediante ecografía y/o RMN cerebral mostraron 20 (51.3%) y 10 (25.6%) pacientes con alteración y

normalidad en las pruebas de imagen, respectivamente. Los hallazgos encontrados en los 20 pacientes figuran descritos en las **Tablas 9 y 10**. El 65% eran niñas y todos los pacientes exhibieron síntomas. Dentro de los 10 pacientes con hallazgos ultrasonográficos normales (2, 7, 19, 27, 28, 31, 39, 50, 60, y 68) el 50% eran sintomáticos: 2 de ellos con hipoacusia bilateral (1 además con retraso psicomotor), 1 con hipoacusia unilateral, y 2 con retraso psicomotor (1 además con retinopatía de grado I).

Tabla 9. Hallazgos en la ecografía y/o resonancia magnética cerebral de 20 pacientes con infección congénita sintomática por CMVh

Nº paciente	Sexo	Año de diagnóstico	Tipo de Afectación	Descripción de la alteración en historia clínica	Tratamiento
1	F	2003	Retraso psicomotor	Hemorragia periventricular derecha e izquierda Quistes subependimarios	NO
3	F	2005	Hipoacusia bilateral	Discreta arteritis de la mastriada bilateral	NO
11	F	2007	Hipoacusia bilateral Alteración en el lenguaje	Dilatación ventricular con pequeña hemorragia local en matriz germinal	Valganciclovir
15	F	2010	Hipoacusia bilateral Retraso madurativo Alteración en el lenguaje Retinopatía	Ventriculomegalia bilateral	No disponible
20	M	2011	Desconocida	Asimetría craneal importante con aplanamiento de la región parietal izquierda	No disponible
22	F	2011	Desconocida	Retraso crecimiento uterino	No disponible
26	M	2012	Hipoacusia bilateral	Alteraciones compatibles con infección congénita	Ganciclovir y Valganciclovir
29	M	2007	Retraso psicomotor Leucodistrofia Ceguera y atrofia óptica	Alteración de la sustancia blanca Tubulopatía Leucoencefalopatía	No disponible
30	F	2007	Retraso psicomotor Catarata	Afectación difusa y simétrica de la sustancia blanca, frontal, temporal, parietal y occipital con hipointensidad Calcificaciones periventriculares	NO
33	M	2009	Hipoacusia bilateral Retraso madurativo Alteración en el lenguaje	Alteración de la sustancia blanca con hiperintensidad en secuencia T2 Atrofia subcortical Desmielinización periférica	Valganciclovir
36	F	2011	Hipoacusia bilateral Retraso madurativo	Afectación difusa de la sustancia blanca supratentorial en ambos lóbulos temporales Mala diferenciación de la sustancia blanca-gris Quistes bilaterales y simétricos en lóbulos occipitales Hipercogénidad puntiforme periventricular Leucoencefalopatía	Valganciclovir
37	F	2010	Hipoacusia unilateral Retraso madurativo	Malformaciones del manto cortical en migración y sulcación Alteración de la sustancia blanca periventricular Displasia opercular Polimicrogiria Paquigiria	Ganciclovir
38	M	2012	Hipoacusia unilateral	Hipercogénidad puntiforme periventricular Calcificaciones periventriculares	Ganciclovir y Valganciclovir
40	M	2002	Alteración en lenguaje y pronunciación	Ventriculomegalia sin calcificaciones	NO
51	M	2012	Hipoacusia unilateral Retraso madurativo Retraso psicomotor	Alteración de la sustancia blanca subcortical en lóbulos supratentoriales	NO
52	M	2012	Hipoacusia unilateral	Hipercogénidad periventricular derecha con lesión quística parenquimatosa Quistes subependimarios bilaterales Arteritis tálamo-estradio Proliferación en ventrículo lateral izquierdo	Ganciclovir y Valganciclovir
56	F	2012	Retraso psicomotor	Calcificaciones periventriculares Quistes subependimarios Hidrocefalia	Ganciclovir y Valganciclovir
59	F	2012	Hipoacusia unilateral	Alteración de la sustancia supra e infratentorial Hipercogénidad medial a núcleos caudados	Valganciclovir
61	F	2013	Hipoacusia bilateral	Quiste periventricular occipital derecho Posible afectación de la sustancia blanca Dudosa alteración de la sulcación del hemisferio cerebral izquierdo	Valganciclovir
67	F	2013	Hipoacusia unilateral	Quistes subependimarios Afectación del parénquima ventricular con lesiones quísticas adyacentes a las astas temporales en ventrículos laterales Pequeños quistes bilaterales en surco caudolaterales Afectación de la sustancia blanca periventricular	Valganciclovir

Tabla 10. Resumen del conjunto de hallazgos obtenidos en las diferentes estudios de neuroimagen realizados en 20 niños con infección congénita sintomática

Alteración	N (%)
Alteración de las sustancia blanca	9 (23.1%)
Quistes (periventriculares, otros)	7 (17.9%)
Hiperecogenicidad (periventricular, asociada a vasculopatía)	6 (15.4%)
Alteración sugestiva de la migración y sulcación	5 (12.8%)
Calcificaciones (periventriculares, corticales, subcorticales)	4 (10.2%)
Ventriculomegalia	3 (7.7%)
Hemorragia (periventricular, otras)	2 (5.1%)
Germinolisis	2 (5.1%)
Leucoencefalopatía	2 (5.1%)
Hipodensidad de las sustancia blanca	1 (2.5%)
Desmielinización	1 (2.5%)
Tubulopatía	1 (2.5%)
Otros (atrofia subcortical, asimetría craneal, CIR, alteraciones compatibles con infección congénita por CMV)	4 (10.2%)

Veinticinco (64.1%) pacientes manifestaron algún tipo de secuela en el neurodesarrollo, siendo la alteración auditiva la más frecuente seguida del retraso psicomotor, déficit visual y microcefalia (**Figura 20**). Dichas alteraciones vienen detalladas en la **Tabla 11**.

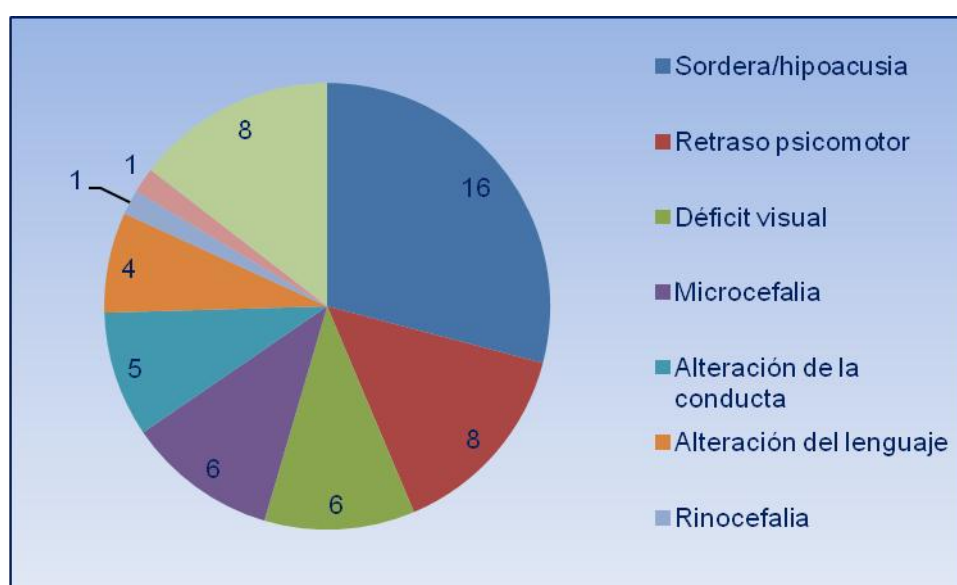


Figura 20. Secuelas en el neurodesarrollo de los 33 pacientes con infección congénita. Seis pacientes fueron excluidos por la falta de datos clínicos.

Tabla 11. Alteraciones en el neurodesarrollo en niños con infección congénita por CMVh

Nº paciente	Sexo	Fecha de nacimiento	Edad dgto (días)	Secuelas en el neurodesarrollo	Tratamiento
1	F	2003	2	Retraso psicomotor	No
3	F	2005	2	Hipoacusia bilateral	No
7	M	2007	9	Cicatriz coriorretiniana temporal en ojo izquierdo	No
10	F	2006	375	Retraso psicomotor	No disponible
				Microcefalia	
				Catarata	
11	F	2007	99	Hipoacusia bilateral	Valganciclovir
				Alteración leve en el lenguaje	
				Alteración motora	
15	F	2009	334	Hipoacusia bilateral	No disponible
				Retinopatía bilateral de prematuridad grado 2	
				Retraso madurativo leve y en el lenguaje	
26	M	2012	4	Hipoacusia bilateral	Ganciclovir y Valganciclovir
				Microcefalia	
				Rinocefalia	
27	F	2005	15	Hipoacusia bilateral	No disponible
28	M	2007	45	Retraso psicomotor	Ganciclovir
				Retinopatía	
29	M	2007	87	Retraso psicomotor	No disponible
				Leucodistrofia	
				Ceguera, atrofia óptica, y excavación ojo izquierdo con intensa palidez papilar bilateral	
30	F	2007	90	Retraso psicomotor	No
				Microcefalia	
				Catarata	
31	F	2007	20	Hipoacusia bilateral	No
				Retraso psicomotor	
33	M	2009	226	Hipoacusia bilateral	Valganciclovir
				Retraso madurativo leve y en el lenguaje	
36	F	2011	18	Hipoacusia bilateral	Valganciclovir
				Retraso madurativo	
37	F	2010	101	Hipoacusia unilateral	Valganciclovir
				Microcefalia	
				Retraso madurativo	
38	M	2012	0	Hipoacusia unilateral	Ganciclovir y Valganciclovir
40	M	2002	4	Alteración en el lenguaje y pronunciación	No
51	M	2010	500	Hipoacusia unilateral	No
				Retraso psicomotor	
				Retraso madurativo	
52	F	2012	1	Hipoacusia unilateral	Ganciclovir y Valganciclovir
56	F	2012	71	Retraso psicomotor	Ganciclovir y Valganciclovir
				Microcefalia	
				Hidrocefalia	
59	F	2012	10	Hipoacusia unilateral	Valganciclovir
61	F	2013	5	Hipoacusia bilateral	Valganciclovir
67	M	2013	2	Hipoacusia unilateral	Valganciclovir
68	F	2013	3	Microcefalia	Valganciclovir

Se diagnosticaron 7 casos de infección congénita fuera del período neonatal mediante la detección de ácidos nucleicos por PCR en las tarjetas de pruebas metabólicas (Guthrie) (**Tabla 12**). Todos los casos nacieron entre el 2007 y 2011, siendo la media [\pm Desviación estándar (DE)] y/o mediana (RI) de edad al diagnóstico de 7.8 (\pm 4.75) y 9.5 (4.5 – 10.7) meses, respectivamente. El peso medio (\pm DE) y/o mediana (RI) de 7 de los pacientes fue 2120 (\pm 674.3) g y 2290 (2265 – 2400) g. La hipoacusia y el retraso psicomotor fueron los motivos más frecuentes de iniciar el estudio. Cinco pacientes tuvieron hipoacusia, 3 con afectación bilateral y 2 unilateral. El primero de ellos había desarrollado hipoacusia profunda (110dB) en oído derecho e hipoacusia leve (40dB) en el izquierdo, el segundo hipoacusia severa (90 dB) en ambos oídos, en el tercero no venía reflejado el grado de hipoacusia, el cuarto hipoacusia moderada en oído derecho (50 dB), y por último, el quinto hipoacusia moderada (no disponible el valor de dB) en oído derecho. El fondo de ojo fue normal en todos los pacientes, salvo en una niña que presentaba retinopatía de prematuridad bilateral de grado II. La RMN cerebral presentó alteraciones en 4 de los 7 pacientes. Se realizó la detección de anticuerpos anti-CMV IgG e IgM en 6 pacientes, 2 de ellos con anti-CMV IgG positiva/ anti-CMV IgM positiva, y 4 anti-CMV IgG positiva/anti-CMV IgM negativa. En 2 pacientes hubo antecedentes maternos relevantes. Una de las gestantes refirió que su pareja 2 meses antes, había sido diagnosticada de síndrome mononucleósico por CMV, realizándosele una determinación de anticuerpos anti-CMV en el 2º trimestre de embarazo, cuyo resultado fue anti-CMV IgG positiva, anti-CMV IgM negativa, y asintomática durante el 1º trimestre. La segunda de ellas refirió un cuadro catarral en el 2º trimestre de embarazo, aunque no se realizó la

detección de anticuerpos anti-CMV IgG e IgM. La media (\pm DE) y/o mediana (RI) de las cinco cargas virales disponibles de las sangres de talón fue 5272.4 ($3.72 \log_{10}$) copias/ml [± 4910.1 ($3.69 \log_{10}$)] y 3458 ($3.53 \log_{10}$) [2260 ($3.35 \log_{10}$) – 5000 ($3.69 \log_{10}$)] copias/ml, respectivamente. Cuatro de los pacientes recibieron tratamiento antiviral (Valganciclovir vía oral 32mg/kg/día), y 3 de ellos no lo recibieron. Un paciente precisó implante coclear, y 2 eran portadores de audífonos.

Nº paciente	Sexo	Fecha de Nacimiento	Peso al nacer (g)	Motivo de estudio	Edad al diagnóstico	Serología	Serologías maternas en el embarazo
11	F	2007	2500	Hipoacusia bilateral	4.5 meses	IgG positiva, IgM negativa	IgG positiva, IgM positiva 2º trimestre Asintomática en 1º trimestre, padre 2 meses antes síndrome mononucleósico por CMV
15	F	2009	620	Hipoacusia bilateral Retraso en el desarrollo del lenguaje	11 meses	IgG positiva, IgM positiva	No realizada
33	V	2009	2250	Hipoacusia bilateral Retraso en el desarrollo del lenguaje Retraso psicomotor	9 meses	IgG positiva, IgM negativa	No realizada
37	F	2010	2600	Hipoacusia unilateral Retraso psicomotor Microcefalia	10 meses	IgG positiva, IgM negativa	No realizada
39	F	2010	2990	Madre VIH Asintomática	3 meses	IgG positiva, IgM negativa	No realizada
50	V	2011	2300	Retraso psicomotor con leve hipotonía axial	1 mes	No realizada	No realizada Cuadro catarral en 2º trimestre de embarazo
51	V	2010	2280	Hipoacusia unilateral Retraso psicomotor	13 meses	IgG positiva, IgM positiva	No realizada

Nº paciente	Carga viral (copias/ml)	Cribado auditivo	Fondo de ojo	RMN cerebral	Tratamiento	Audifono/Implante coclear
11	No realizada	OD: no pasa OI: no pasa	Normal	Normal	Valganciclovir	Audífonos
15	13.780	OD: no pasa OI: no pasa	Retinopatía bilateral	Alterada	Valganciclovir	Audífonos
33	3.458	OD: no pasa OI: no pasa	Normal	Alterada	Valganciclovir	Implante coclear
37	5.000	OD: pasa OI: no pasa	Normal	Alterada	Valganciclovir	No
39	1.864	OD: pasa OI: pasa	Normal	No realizada	No	No
50	2.260	OD: pasa OI: pasa	Normal	Normal	No	No
51	No realizada	OD: no pasa OI: pasa	Normal	Alterada	No	No

4.2.2 DIAGNÓSTICO PRENATAL

Entre el año 2006 y 2013, 17 gestantes fueron diagnosticadas de infección congénita por CMVh (2 en 2006, 4 en 2007, 1 en 2008, 1 en 2009, 1 en 2010, 3 en 2011, 2 en 2012 y 3 en 2013). La media (\pm DE) y/o mediana (RI) de edad maternal fue 30.3 (\pm 5.4) y 30 [27 - 34] años, respectivamente. Dieciséis pacientes (94.1%) eran de raza blanca y 1 (5.9%) latinoamericana. Seis pacientes (35.3%) refirieron síntomas catarrales (fiebre, rinitis, mialgias) en algún momento del embarazo, y 11 (29.4%) no refirieron síntomas. Catorce (82.3%) de las pacientes fueron diagnosticadas en el 2º trimestre del embarazo. Más de la mitad de las pacientes (52.9%) estuvieron en riesgo de adquirir CMVh durante el embarazo por contacto con niños menores de 3 años, ya que 6 (35.3%) pacientes eran secundigestas, 2 (11.7%) tercigestas, y 1 (5.9%) cuartigesta. Cinco (29.4%) fueron primigestas. (Tabla 13), y en 3 pacientes se desconocía varios datos clínicos, por lo que se excluyeron del análisis estadístico realizado entre las diferentes variables clínicas y los diferentes genotipos.

Debido a la falta de cribado serológico maternal universal de CMVh, la detección de anticuerpos anti-CMV IgG se determinó en 13 (76.4%) pacientes, o bien por presentar algún síntoma, o bien por algún hallazgo ecográfico anómalo. Siete (41.1%) pacientes presentaron el perfil serológico anti-CMV IgG positivo/ anti-CMV IgM positivo (5 de ellas con avidez baja, 1 avidez indeterminada y en 1 no se determinó la avidez). Cuatro (23.6%) pacientes tuvieron una determinación positiva para anti-CMV IgG, pero 3 con anti-CMV IgM negativa y 1 con anti-CMV IgM indeterminada. Por último, en dos de ellas

se realizó la determinación de anti-CMV IgG, la cual fue positiva para ambas pero la determinación de anti-CMV IgM no se tramitó en la petición (**Tabla 13**).

Entre los 14 fetos infectados en los que se disponía de datos clínicos, 11 (78.5%) pacientes mostraron hallazgos extracerebrales anormales y 3 ninguno (21.4%). Los hallazgos extracerebrales más frecuentes fueron hepatomegalia (52.9%), cardiomegalia (47.05%), ascitis (23.5%), placentomegalia (23.5%), y esplenomegalia (17.6%). Los hallazgos cerebrales estuvieron presentes en 12 pacientes (70.6%), y en 2 no (11.76%). Entre los hallazgos cerebrales más frecuentemente encontrados, destacaron la hiperecogenicidad puntiforme parenquimatosa (29.4%) y la ventriculomegalia (23.5%) (**Tabla 13**).

Diez pacientes (58.8%) no recibieron tratamiento, pero decidieron la interrupción voluntaria del embarazo y 4 (23.5%) si recibieron tratamiento. La media (\pm DE) y mediana (RI) de las semanas a la cual se interrumpió voluntariamente el embarazo fue 22.4 (\pm 3.7) y 22 [21 - 22] semanas, respectivamente. En aquellas pacientes en las que el recién nacido llegó a término, la media (\pm DE) y mediana (RI) de las semanas fue 38.7 (\pm 0.9) y 38.5 [38 - 39.2] semanas (**Tabla 13**).

Tabla 13. Características principales de las diecisiete gestantes con diagnóstico prenatal de infección congénita						
Nº paciente	Edad	Año de diagnóstico	Síntomas	Tiempo de diagnóstico	Antecedentes obstétricos	Serología
4	37	2006	Asintomática	2º trimestre	No conocido	IgG positiva, IgM no realizada
6	18	2006	Transaminasas elevadas	1º trimestre	Primigesta	IgG positiva, IgM positiva, Avidez baja
8	35	2007	Asintomática	2º trimestre	No conocido	No conocida
9	24	2007	Asintomática	2º trimestre	No conocido	No conocida
12	34	2007	Asintomática	2º trimestre	Secundigesta IVE previo por infección por CMV	IgG positiva, IgM positiva, Avidez no realizada
13	36	2007	Asintomática	2º trimestre	Secundigesta	IgG positiva, IgM positiva, Avidez baja
14	24	2008	Asintomática	2º trimestre	Primigesta	No realizada
17	34	2010	Síntomas catarrales	2º trimestre	Secundigesta	No realizada
18	39	2011	Asintomática	2º trimestre	Secundigesta	IgG positiva, IgM no realizada
24	26	2011	Asintomática	2º trimestre	Primigesta	IgG positiva, IgM negativa, Avidez Indeterminada
25	29	2012	Sinusitis	2º trimestre	Tercigesta	IgG positiva, IgM negativa
32	27	2009	Asintomática	2º trimestre	Primigesta	IgG positiva, IgM negativa
35	31	2011	Síntomas catarrales	3º trimestre	Secundigesta	IgG positiva, IgM negativa
58	28	2012	Asintomática	2º trimestre	Primigesta	IgG positiva, IgM positiva, Avidez baja
62	33	2013	Síndrome gripal con elevación de GPT	2º trimestre	Cuartigesta	IgG positiva, IgM positiva, Avidez baja
63	30	2013	Transaminasas elevadas Síntomas catarrales	1º trimestre	Tercigesta	IgG positiva, IgM positiva, Avidez baja
64	30	2013	Asintomática	2º trimestre	Secundigesta	IgG positiva, IgM indeterminada, Avidez Indeterminada

Tabla 13. Características principales de las diecisiete gestantes con diagnóstico prenatal con infección congénita (cont.)					
Nº paciente	Datos analíticos	Carga viral (copias/ml)	Nº paciente	Datos analíticos	Carga viral (copias/ml)
4	Embarazada con Hemoglobina 8.1 g/dl, Hematíes 2.43 x 10 ⁶ /µl, Leucocitos 2.37 x 10 ³ /µl	SF*: 895.805	24	Hemograma fetal: Hemoglobina 12.3 g/dl, Hematíes 2.92 x 10 ⁶ /µl, Leucocitos 5.7 x 10 ³ /µl Plaquetas: 21000/µl	SF: 10.800
6	Embarazada con Hemoglobina 12.5 g/dl, Hematíes 4.16 x 10 ⁶ /µl, Leucocitos 6.7 x 10 ³ /µl	LA**: 33.090.003	25	Hemograma fetal: Hemoglobina 12.6 g/dl, Hematíes 2.89 x 10 ⁶ /µl, Leucocitos 4.0 x 10 ³ /µl Plaquetas: 11000/µl	SF: 86.000
8	Embarazada con Hemoglobina 12 g/dl, Hematíes 3.24 x 10 ⁶ /µl, Leucocitos 12.8 x 10 ³ /µl	LA: 12.305.106	32	Hemograma fetal: Hemoglobina 6.3 g/dl, Hematíes 1.36 x 10 ⁶ /µl, Leucocitos 5.1 x 10 ³ /µl Plaquetas: 26000/µl	LA: 21.037.061
9	Embarazada con Hemoglobina 12.7 g/dl, Hematíes 3.37 x 10 ⁶ /µl, Leucocitos 4.51 x 10 ³ /µl	SF: 145.781	35	Ninguna analítica disponible	SF: 123.845
12	Hemograma fetal: Hemoglobina 7.3 g/dl, Hematíes 1.51 x 10 ⁶ /µl, Leucocitos 4.01 x 10 ³ /µl Plaquetas: 14000/µl	SF: No disponible	58	Hemograma fetal: Hemoglobina 10.2 g/dl, Hematíes 2.14 x 10 ⁶ /µl, Leucocitos 19.4 x 10 ³ /µl Plaquetas: 20000/µl	SF: 3.450.000
13	Hemograma fetal: Hemoglobina 12.6 g/dl, Hematíes 2.66 x 10 ⁶ /µl, Leucocitos 4.65 x 10 ³ /µl Plaquetas: 80000/µl	LA: 27.235.908	62	Hemograma fetal: Hemoglobina 11.9 g/dl, Hematíes 3.27 x 10 ⁶ /µl, Leucocitos 4.3 x 10 ³ /µl Plaquetas: 162000/µl	SF: 64.1
14	Ninguna analítica disponible	LA: 26.198.086	63	Hemograma fetal: Hemoglobina 10.4 g/dl, Hematíes 3.19 x 10 ⁶ /µl, Leucocitos 4.6 x 10 ³ /µl Plaquetas: 131000/µl	LA: 1.080.000 SF: 1.070
17	Hemograma fetal: Hemoglobina 6.1 g/dl, Hematíes No realizado, Leucocitos 35 x 10 ³ /µl Plaquetas: 20000/µl	SF: 11.757	64	Hemograma fetal: Hemoglobina 12.6 g/dl, Hematíes 3.16 x 10 ⁶ /µl, Leucocitos 3.5 x 10 ³ /µl Plaquetas: 65000/µl	SF: No disponible
18	Ninguna analítica disponible	SF: No realizada			

* SF: Sangre fetal
**LA: Líquido amniótico

Tabla 13. Características principales de las diecisiete gestantes con diagnóstico prenatal de infección congénita (cont.)					
Nº paciente	Hallazgos extracerebrales	Hallazgos cerebrales	Tratamiento	Interrupción voluntaria del embarazo	Término de semanas de gestación
4	No conocidos	No conocidos	No conocido	No conocido	No conocido
6	Ninguna	Encefalitis Polimicrogira Hemorragias intraparenquimatosas ventriculares y a espacio subaracnoideo	No	Si	20 + 4
8	No conocidos	No conocidos	No conocido	No conocido	No conocido
9	No conocidos	No conocidos	No conocido	No conocido	No conocido
12	Ninguna	Quiste bilateral de plexos coroides	No	Si	18 + 6
13	Afectación renal y suprarrenal con dilatación pélvica, leve hiperecogenicidad del parénquima e hipoplasia Afectación hepática Cardiomegalia Esplenomegalia	Ventriculomegalia discreta	No	Si	21 + 5
14	Ecografía con anomalías fetales no descritas	Ecografía con anomalías fetales no descritas	No	Si	22 + 4
17	Ascitis Derrame pericárdico Fístula arterio-venosa a nivel abdominal Hepatomegalia	Hidrops Fetal	No	Si	22 + 4
18	Cardiomegalia tetracameral Derrame Pleural Hipoplasia Pulmonar Edema Generalizado Ascitis Hiperecogenicidad Intestinal Hepatomegalia Placentomegalia	Hiperecogenicidades puntiformes parenquimatosas múltiples en ambos hemisferios cerebrales Ventriculomegalia moderada Desestructuración hemisferios con coágulos intraventriculares y aumento del espacio extraxial Hidrocefalia	No	Si	24 + 2

Tabla 13. Características principales de las diecisiete gestantes con diagnóstico prenatal de infección congénita (cont.)						
Nº paciente	Hallazgos extracerebrales	Hallazgos cerebrales	Tratamiento	Interrupción voluntaria del embarazo	Término de semanas de gestación	
24	Cardiomegalia Hepatomegalia Placentomegalia	Ventriculomegalia Leucomalacia periventricular Hiperecogenicidad puntiforme	Ganciclovir Valganciclovir Inmunoglobulina hiperimmune anti CMV	No	38 + 1	
25	Cardiomegalia tetracameral leve Derrame pleural bilateral Ascitis Hepatomegalia Esplenomegalia	Hdrops fetal Hiperecogenicidad de la sustancia blanca periventricular	No	Si	21 + 6	
32	Cardiomegalia Hepatomegalia	Ventriculomegalia bilateral asimétrica	No	Si	22 + 4	
35	Cardiomegalia tetracameral Derrame pericárdico leve Hepatomegalia Esplenomegalia Placentomegalia	Hiperecogenicidades puntiformes parenquimatosas múltiples periventriculares e intraparenquimatosas	No	Si	32 + 6	
58	Cardiomegalia tetracameral Derrame pericárdico leve Ascitis Hepatomegalia Placentomegalia leve	Hiperecogenicidades puntiformes parenquimatosas periventriculares Posible leucomalacia periventricular	No	Si	22 + 3	
62	Ninguna	Ninguna	Inmunoglobulina hiperimmune anti CMV	No	40 + 1	
63	Cardiomegalia tetracameral Hepatomegalia	Pequeñas lesiones quísticas en parénquima periventricular y en ambos surcos caudolaterales	Inmunoglobulina hiperimmune anti CMV Valaciclovir	No	39 + 1	
64	Biometría fetal próxima a percentiles bajos	Imagen en el SNC en relación con proceso infeccioso	Inmunoglobulina hiperimmune anti CMV	No	38 + 2	

Siete líquidos amnióticos y 11 sangres fetales fueron estudiados. La media (\pm DE) y mediana (RI) de las cargas virales de los líquidos amnióticos disponibles ($n = 6$) fueron 20157694 ($7.3\log_{10}$) (± 11663849.26 ó $7.06\log_{10}$) copias/ml y 23617573.5 ($7.37\log_{10}$) [14488094.75 ó $7.16\log_{10}$ - 26976452.5 ó $7.43\log_{10}$] copias/ml, respectivamente. Los valores de los diferentes parámetros analíticos así como de las cargas virales estudiadas en los hemogramas fetales, se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Parámetros analíticos estudiados en las sangres fetales			
Parámetro (unidades)	N	Media (\pm DE)	Mediana (RI)
Leucocitos (x 1000/ μ l)	10	9,02 ($\pm 10,27$)	4,62 [4,08 - 5,55]
Hematíes (x 10^6 / μ l)	10	2,56 ($\pm 0,72$)	2,89 [2,1 - 3,1]
Hemoglobina (g/dl)	10	10,23 ($\pm 2,68$)	11,1 [8,025 - 12,5]
Plaquetas (x 1000/ μ l)	10	55 ($\pm 53,76$)	23,5 [20 - 76,25]
Volumen corpuscular medio (fl)	9	128,35 ($\pm 11,85$)	130,9 [123 - 132,7]
Carga viral (copias/ml)	9	590632,5 ($\pm 1192742,13$)	104922,5 [11517,75 - 333287]
Carga viral \log_{10} (copias/ml)	9	5,77 ($\pm 6,07$)	5,02 [4,06 - 5,52]

4.2.3 NIÑOS CON INFECCION ADQUIRIDA

En el estudio se incluyeron 40 pacientes de los que el 60 % fueron niños y el 40% niñas. La media (\pm DE) y/o mediana (RI) de edad a la cual se llevó a cabo el diagnóstico de infección adquirida fue de 11,1 ($\pm 15,3$) y 7,5 (3 - 12) meses, respectivamente. Los motivos por los cuales las muestras fueron remitidas al laboratorio de virología se encuentran incluidos en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Motivos más frecuentes de remisión de las muestras al laboratorio de virología	
Síntomas/Signos clínicos	N (%)
Síndrome febril	16 (40)
Infección respiratoria	11 (27.5)
Colestasis	5 (12.5)
Adenitis/submandibular/axilares	5 (12.5)
Hepatoesplenomegalia	2 (5)
Diarrea y Vómitos	1 (2.5)

4.2.4 PACIENTES TRASPLANTADOS

Sesenta y dos pacientes fueron incluidos en el estudio de los que 47 (83.9%) eran varones. La media (\pm DE) y mediana (RI) de edad fue 54.2 (\pm 13.3) y 56.5 [45 - 64.5] años, respectivamente. Treintaitrés (53.2%) eran trasplantados renales, 19 (30.6%) hepáticos y 10 (16.1%) cardíacos. Previo al trasplante, el 87.1% de los pacientes eran receptores con detección de anticuerpos IgG anti-CMVh positiva. La infección por CMVh fue diagnosticada tras el trasplante en una media (\pm DE) y/o mediana (RI) de 72.5 (\pm 48.5) ó 60 [45 - 90] días. El 69.3% (43) presentaron viremia asintomática y el 30.6% (19) síndrome viral, de los que 7 (36.8%) desarrollaron enfermedad, y 2 (10.5%) de ellos sufrieron una recaída durante del tratamiento. Todos los pacientes con enfermedad presentaron positividad para las determinaciones de antigenemia, carga viral en plasma y en células. La antigenemia detectó el 77.1% (125/162) del total de episodios, sin embargo, la carga viral en plasma y en células el 92.3% (156/162). Treinta (18.5%) ensayos de determinación de la carga viral en plasma y en células precedieron a la detección del antígeno pp65. Sin embargo, la antigenemia fue positiva en 7 (4.3%) episodios de 6 pacientes en los que la carga viral en plasma (3) o en células (4) fue negativa.

4.3 DISTRIBUCIÓN DE LOS GENOTIPOS Y SU RELACIÓN CON LAS DIFERENTES VARIABLES CLÍNICAS ESTUDIADAS

4.3.1 GLICOPROTEÍNA B

4.3.1.1 Glicoproteína B en infección congénita

Todos los genotipos de glicoproteína B (gB1, gB2, gB3, gB4) fueron detectados. En todos los casos estudiados en los que los pacientes aportaban más de una muestra, se detectaron los mismos genotipos en todas ellas. En una muestra (1.8%) de un niño no se pudo asignar el genotipo de glicoproteína B debido a un resultado repetido de amplificación negativa, por lo que fue excluido del estudio.

La distribución de los genotipos de glicoproteína B de las muestras de infección congénita se encuentra representada en la **Figura 21**. En global, cuando se tomaba una muestra por paciente, el genotipo de glicoproteína B más prevalente fue gB3 (34.5%), seguido de gB1 (27.3%), gB2 (25.4%), gB4 (9.1%), gB1-gB3 (1.8%), y gB1-gB2 (1.8%) (**Figura 21A**). Sin embargo, cuando las muestras eran estratificadas por tipo de paciente como niños o embarazadas, la prevalencia era algo diferente. En niños, el genotipo 1, 2 y 3 de glicoproteína B presentaban la misma frecuencia (28.9%), gB4 representó el 10.5% y el genotipo mixto gB1-gB3 (2.6%) (**Figura 21B**). Mientras, el genotipo más frecuentemente encontrado en gestantes fue gB3 (47.05%), seguido de gB1 (23.5%), gB2 (17.6%), gB4 (5.9%) y el gB1-gB2 (5.9%) (**Figura 21C**).

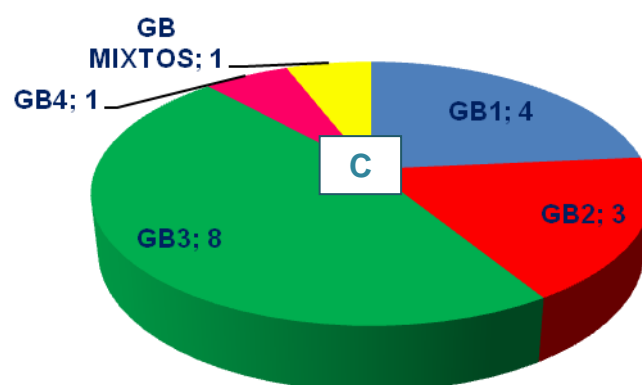
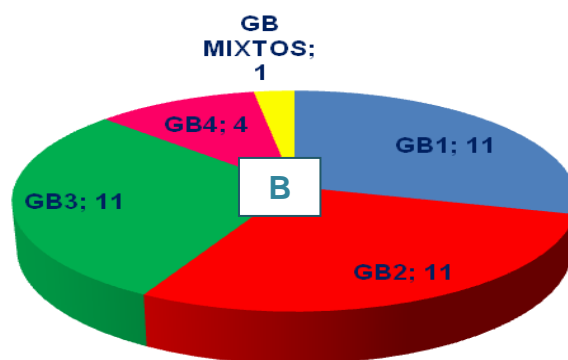
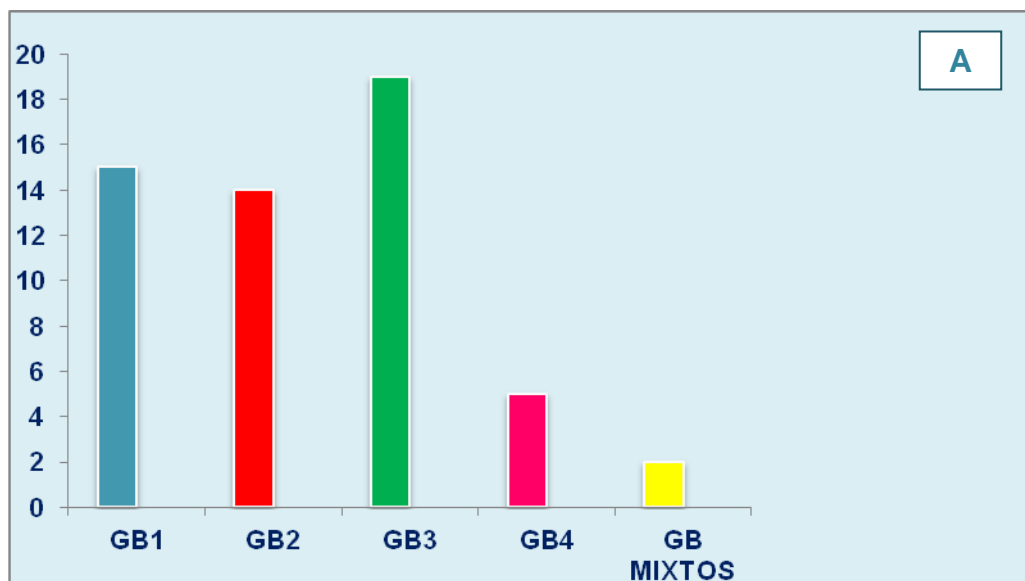


Figura 21. Distribución de los genotipos de glicoproteína B en muestras de infección congénita. A: Global. B: Niños. C: Embarazadas

Cuando se estudiaba el patrón estacional de los genotipos en períodos de 3 años, se observó que todos los genotipos circularon a lo largo de los años, a excepción de gB4 entre los años 2002-2004 y 2008-2010, y gB2 como genotipo único en 2008-2010 aunque estuvo presente como genotipo mixto (**Figura 22**).

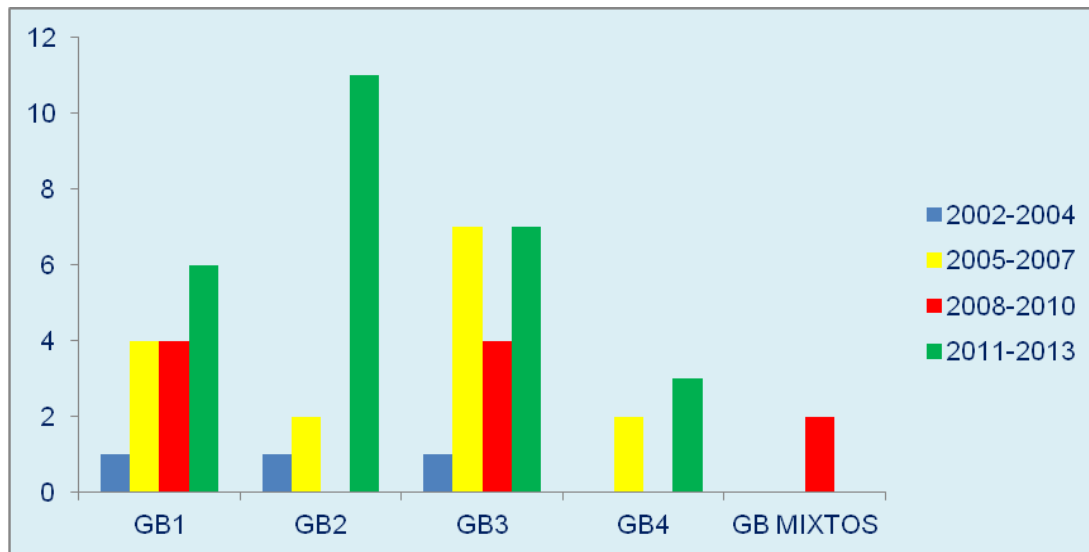


Figura 22. Distribución de los genotipos de glicoproteína B en función del año de diagnóstico de infección congénita

Relación entre los genotipos de glicoproteína B y las diferentes variables estudiadas

Las medias (\pm DE) y/o medianas (RI) de los diferentes parámetros analíticos atendiendo al diferente genotipo de glicoproteína B vienen descritas en la **Tabla 16**, y representadas en los gráficos de la **Figura 23**. No hubo diferencia entre las medias y/o medianas de leucocitos ($p = 0.164$), hematíes ($p = 0.390$), hemoglobina ($p = 0.761$), plaquetas ($p = 0.390$), GPT ($p = 0.692$), GOT ($p = 0.07$), GGT ($p = 0.661$), bilirrubina directa ($p = 0.125$), bilirrubina total ($p = 0.661$), y albúmina ($p = 0.586$) entre los diferentes genotipos de glicoproteína B.

Tabla 16. Parámetros analíticos y su relación con el genotipo de glicoproteína B en los niños con infección congénita								
	Glicoproteína B genotipo 1		Glicoproteína B genotipo 2		Glicoproteína B genotipo 3		Glicoproteína B genotipo 4	
Parámetro (unidades)	Media (±DE)	Mediana (RI)	Media (±DE)	Mediana (RI)	Media (±DE)	Mediana (RI)	Media (±DE)	Mediana (RI)
Leucocitos (x 1000/μl)	10254 (± 3071,98)	11000 (7200 - 12160)	13072,85 (± 3828,40)	12940 (9300 - 15700)	9048,57 (± 3316,02)	8100 (6400 - 12060)	21080 (± 13887,57)	21080 (11260 - 30900)
Hematíes (x 10 ⁶ /μl)	3,73 (± 1,06)	3,42 (3,09 - 5,53)	4,47 (± 0,86)	4,08 (3,69 - 5,58)	3,79 (± 0,73)	3,98 (3 - 4,54)	4,25 (± 0,20)	4,25 (4,11 - 4,40)
Hemoglobina (g/dl)	13,64 (± 4,19)	13,4 (10,1 - 15,2)	14,97 (± 3,50)	14,2 (11,8 - 19,7)	13,88 (± 2,97)	14,8 (10,6 - 15,4)	16,3 (± 2,96)	16,3 (14,2 - 18,4)
Plaquetas (x 1000/μl)	173,2 (± 59,22)	171 (127 - 187)	252,57 (± 116,54)	229 (166 - 357)	318,71 (± 229,63)	244 (137 - 545)	157,50 (± 105,35)	157,5 (83 - 232)
Enzimas hepáticas								
GPT (U/l)	33,6 (± 32,98)	24 (13 - 33)	19,66 (± 8,11)	18 (17 - 25)	23,85 (± 14,46)	19 (13 - 29)	26 (± 4,24)	26 (23 - 29)
GOT (U/l)	155,66 (± 139,57)	97 (55 - 315)	52,85 (± 18,00)	50 (48 - 63)	47,85 (± 19,26)	42 (34 - 52)	32 (± 16,97)	32 (20 - 44)
GGT (U/l)	139,75 (± 76,04)	144 (79,5 - 200)	201,42 (± 209,22)	188 (25 - 268)	120,14 (± 77,38)	157 (51 - 184)	91 (± 21,21)	91 (76 - 106)
Bilirrubina total (mg/dl)	6,7 (± 5,41)	6,20 (2,15 - 12,80)	2,2 (± 1,89)	2,28 (0,36 - 3,90)	4,89 (± 5,59)	2,84 (0,32 - 9,1)	2,95 (± 0,91)	2,95 (2,30 - 3,60)
Bilirrubina directa (mg/dl)	1,86 (± 0,62)	1,86 (1,42 - 2,31)	0,59 (0)	0,59 (-)	0,69 (± 0,38)	0,8 (0,40 - 0,99)	0,98 (± 0,49)	0,98 (0,63 - 1,33)
Albúmina (g/dl)	4,62 (± 1,81)	3,8 (3,36 - 6,70)	3,99 (± 0,34)	4 (3,8 - 4,13)	3,67 (± 0,33)	3,62 (3,40 - 3,95)	-	-

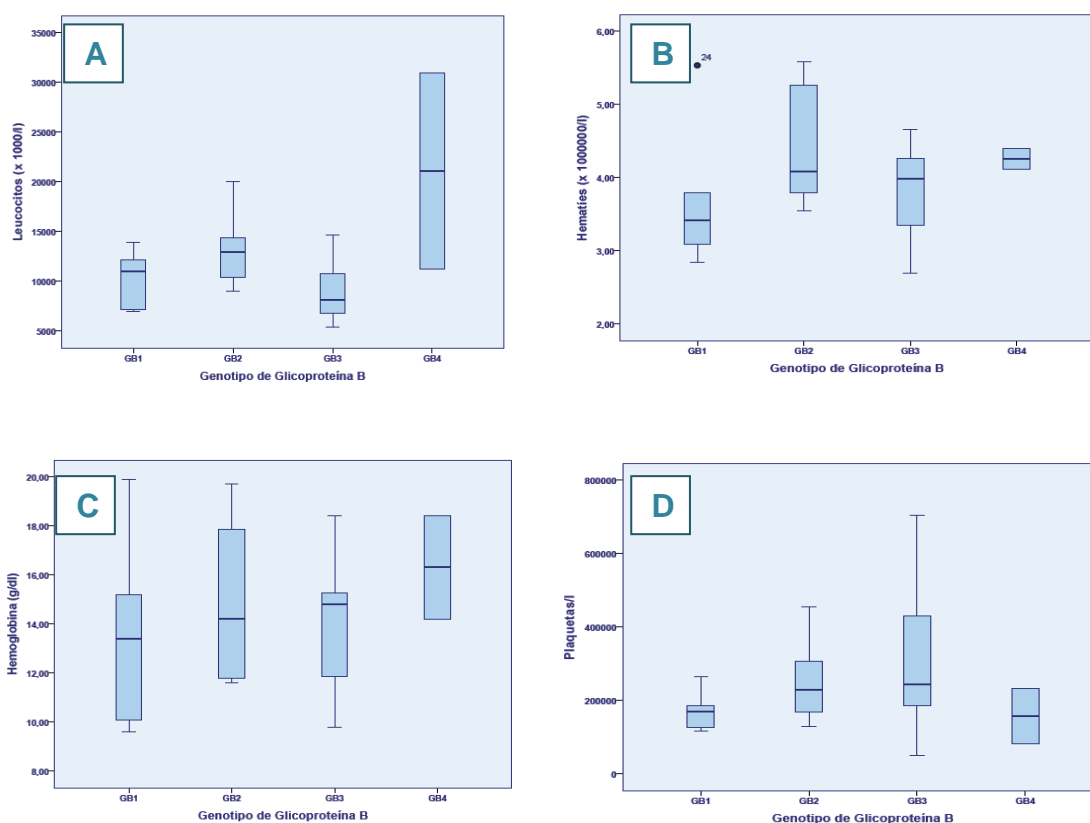


Figura 23. Parámetros analíticos atendiendo a los diferentes genotipos de glicoproteína B en los niños con infección congénita. A: Leucocitos, B: Hematíes, C: Hemoglobina, D: Plaquetas, E: GPT, F: GOT, g: GGT, H: Bilirrubina total, I: Bilirrubina directa, J: Albúmina

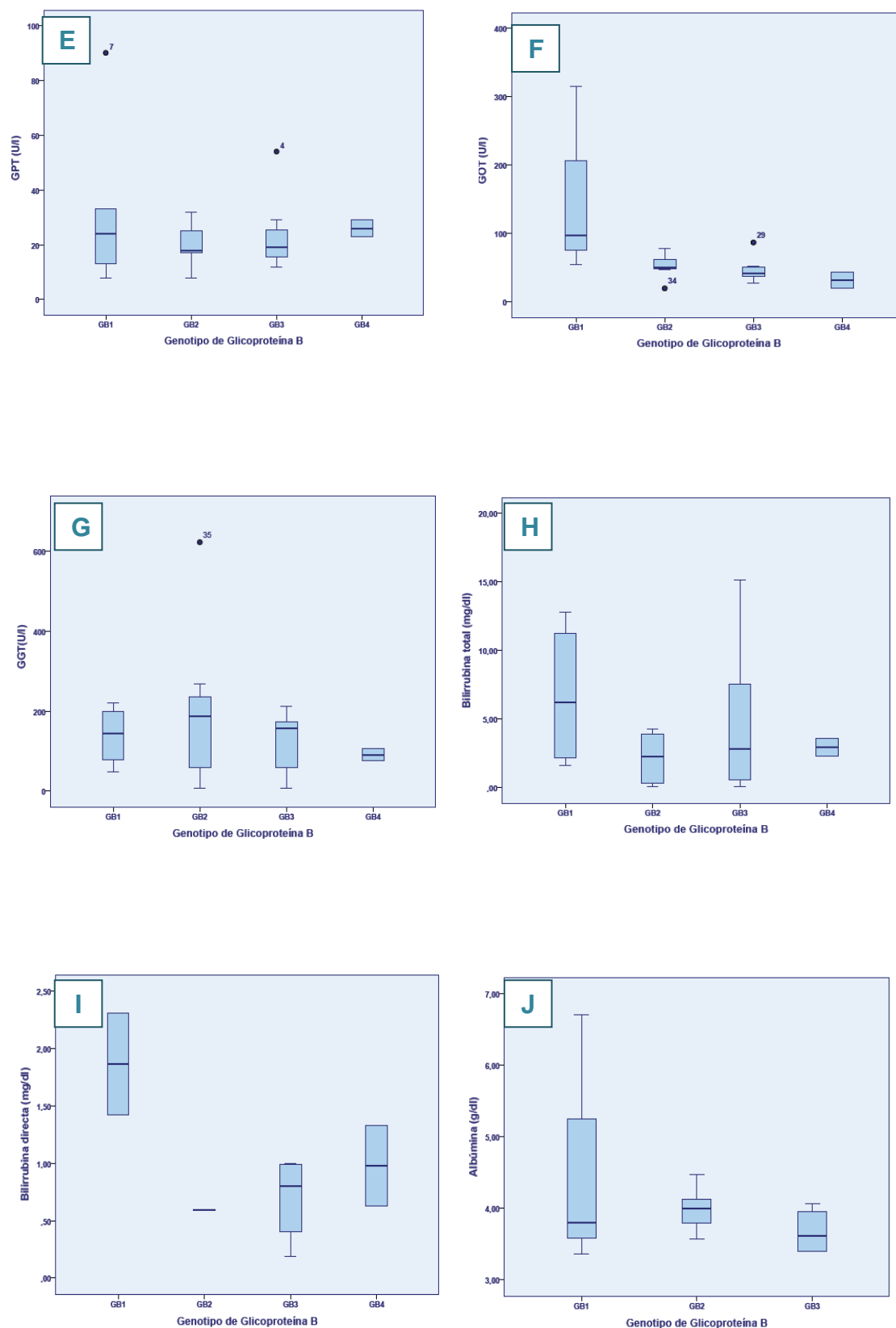


Figura 23 (continuación). Parámetros analíticos atendiendo a los diferentes genotipos de glicoproteína B en los niños con infección congénita. A: Leucocitos, B: Hematíes, C: Hemoglobina, D: Plaquetas, E: GPT, F: GOT, G: GGT, H: Bilirrubina total, I: Bilirrubina directa, J: Albúmina

Las características clínicas estudiadas en los niños con infección congénita atendiendo al genotipo de glicoproteína B son mostradas en la **Tabla 17**. El 90% de los niños pertenecientes al genotipo gB1 manifestaron síntomas, el 50% afectación neurosensorial, el 40% afectación comunicativa y motora, el 50% pruebas de imagen alteradas, y el 20% recibió tratamiento. Aproximadamente el 90% de los pacientes con genotipo gB2 presentaron síntomas, casi el 80% afectación neurosensorial, el 55.5% afectación comunicativa, el 44.4% afectación motora y neurológica, el 77.8% pruebas de imagen alteradas, y el 66.6% recibió tratamiento. El 72.7% de los niños con genotipo gB3 fueron sintomáticos con afectación neurosensorial, menos del 30% presentó afectación comunicativa, motora o neurológica, el 63.6% pruebas de imagen alteradas, y el 45.4% recibió tratamiento. Por último, la mayoría de los niños con genotipo gB4 fueron asintomáticos (66.6%), salvo un niño que tenía afectación ocular, comunicativa, motora, y además recibió tratamiento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las variables estudiadas y los diferentes genotipos, salvo con gB2 y gB3. En aquellos pacientes con genotipo gB2 fue más frecuente la presencia de quistes periventriculares ($p = 0.05$), mientras que en el genotipo gB3 era frecuente no presentar afectación motora ($p = 0.02$).

Características	Glicoproteína B genotipo 1 (n = 10) ^a			Glicoproteína B genotipo 2 (n = 9)			Glicoproteína B genotipo 3 (n = 11) ^a			Glicoproteína B genotipo 4 (n = 3)		
	Número (%)	OR (IC 95%)	P	Número (%)	OR (IC 95%)	P	Número (%)	OR (IC 95%)	P	Número (%)	OR (IC 95%)	P
Edad al diagnóstico												
Mediana (Rt) días	17 (4 - 49,5)		0,91	16 (2 - 71)		0,65	3,5 (2,5 - 5,0)		0,70	4 (2 - 25)		0,40
Sexo												
Femenino	6 (60)	0,62 (0,15 - 2,48)	0,50	7 (77,8)	1,38 (0,27 - 8,08)	0,46	8 (72,7)	1,69 (0,34 - 9,69)	0,35	1 (33,3)	0,20 (0,003 - 3,00)	0,19
Sintomático	9 (90)	2,07 (0,16 - 115,70)	0,47	8 (88,9)	1,74 (0,14 - 98,33)	0,54	8 (72,7)	0,30 (0,02 - 3,25)	0,22	1 (33,3)	0,17 (0,002 - 15,67)	0,30
Asintomático	1 (10)	0,48 (0,008 - 5,92)	0,47	1 (11,1)	0,57 (0,01 - 7,12)	0,54	3 (27,3)	3,23 (0,30 - 45,91)	0,22	2 (66,6)	5,70 (0,06 - 509,48)	0,30
Hepatoesplenomegalia	0 (0)	-	0,49	1 (11,1)	2,53 (0,02 - 215,66)	0,50	1 (9,1)	1,90 (0,10 - 33,70)	0,59	0 (0)	-	0,81
Rash petequeal	0 (0)	-	0,34	1 (11,1)	1,24 (0,01 - 27,12)	0,65	2 (18,2)	4,01 (0,18 - 261,89)	0,28	0 (0)	-	0,72
Retraso crecimiento uterino	4 (40)	3,04 (0,42 - 22,49)	0,17	2 (22,2)	0,86 (0,06 - 6,57)	0,62	2 (18,2)	0,51 (0,04 - 3,66)	0,37	0 (0)	-	0,42
Afectación neurossensorial	5 (50)	0,63 (0,06 - 9,03)	0,50	7 (77,8)	2,42 (0,20 - 134,87)	0,24	8 (72,7)	1,22 (0,13 - 16,46)	0,61	1 (33,3)	0,25 (0,003 - 23,51)	0,40
Auditiva	3 (30)	0,55 (0,05 - 5,26)	0,41	7 (77,8)	6,53 (0,62 - 349,80)	0,08	6 (54,5)	0,90 (0,13 - 6,29)	0,60	0 (0)	-	0,13
Hipoacusia bilateral	2 (20)	0,93 (0,06 - 8,61)	0,66	5 (55,5)	5,38 (0,69 - 52,38)	0,06	2 (18,2)	0,33 (0,02 - 2,52)	0,20	0 (0)	-	0,41
Hipoacusia unilateral	1 (10)	0,47 (0,008 - 5,85)	0,47	2 (22,2)	0,87 (0,06 - 7,57)	0,63	4 (36,3)	2,76 (0,34 - 25,47)	0,23	0 (0)	-	0,52
Ocular	3 (30)	3,98 (0,38 - 43,37)	0,15	0 (0)	-	0,09	2 (18,2)	0,81 (0,06 - 7,38)	0,61	1 (33,3)	3,71 (0,04 - 329,25)	0,40
Afectación comunicativa	4 (40)	1,32 (0,18 - 9,30)	0,52	5 (55,5)	1,83 (0,29 - 12,49)	0,35	3 (27,3)	0,30 (0,03 - 1,88)	0,13	1 (33,3)	1,24 (0,01 - 104,57)	0,70
Afectación motora	4 (40)	2,41 (0,33 - 18,17)	0,16	4 (44,4)	1,82 (0,26 - 12,41)	0,36	1 (9,1)	0,10 (0,002 - 1,05)	0,02	1 (33,3)	1,94 (0,02 - 165,56)	0,57
Afectación neurológica	2 (20)	0,72 (0,05 - 5,58)	0,54	4 (44,4)	2,56 (0,34 - 17,70)	0,24	3 (27,3)	0,81 (0,10 - 5,30)	0,57	0 (0)	-	0,32
Microcefalia	1 (10)	0,46 (0,008 - 5,46)	0,45	2 (22,2)	1,13 (0,08 - 10,36)	0,62	3 (27,3)	1,83 (0,19 - 17,15)	0,40	0 (0)	-	0,62
Pruebas de imagen alteradas	5 (50)	1,41 (0,17 - 18,10)	0,54	7 (77,8)	2,26 (0,31 - 27,91)	0,31	7 (63,6)	0,87 (0,14 - 5,81)	0,58	0 (0)	-	0,11
Alteración de la sustancia blanca	1 (10)	0,25 (0,004 - 2,86)	0,20	5 (55,5)	3,56 (0,53 - 26,80)	0,11	4 (36,3)	1,13 (0,17 - 7,01)	0,58	0 (0)	-	0,42
Calcificaciones cerebrales	0 (0)	-	0,75	0 (0)	-	0,71	1 (9,1)	-	0,39	0 (0)	-	0,92
Calcificaciones periventriculares	1 (10)	0,71 (0,01 - 9,47)	0,63	1 (11,1)	0,58 (0,01 - 7,47)	0,55	3 (27,3)	2,70 (0,25 - 38,80)	0,29	0 (0)	-	0,66
Calcificaciones de las arterias estriadas	0 (0)	-	0,42	1 (11,1)	1,12 (0,01 - 24,59)	0,68	2 (18,2)	3,59 (0,16 - 235,69)	0,31	0 (0)	-	0,80
Leucoencefalopatía	1 (10)	0,79 (0,01 - 11,82)	0,67	2 (22,2)	2,74 (0,16 - 44,86)	0,32	1 (9,1)	0,57 (0,009 - 8,36)	0,55	0 (0)	-	0,65
Quistes periventriculares/matriz germinal	1 (10)	0,57 (0,01 - 6,96)	0,54	4 (44,4)	6,61 (0,71 - 93,73)	0,05	1 (9,1)	0,27 (0,005 - 3,01)	0,23	0 (0)	-	0,62
Ventriculomegalia	1 (10)	1,63 (0,02 - 36,89)	0,57	1 (11,1)	1,12 (0,01 - 24,59)	0,68	1 (9,1)	0,80 (0,01 - 17,44)	0,68	0 (0)	-	0,80
Tratamiento	2 (20)	0,67 (0,04 - 11,17)	0,56	6 (66,6)	1,70 (0,24 - 14,74)	0,41	5 (45,4)	0,83 (0,11 - 6,17)	0,58	1 (33,3)	0,70 (0,008 - 60,31)	0,67

Nota: A uno de los pacientes no se le pudo asignar el genotipo de glicoproteína B. Seis pacientes (2 gB1, 2 gB2, 1 gB3, y 1 gB4) no se encuentran incluidos en la tabla porque no se dispuso de ningún dato clínico a El único genotipo mixto encontrado en niños (gB1-gB3) se ha contabilizado en el grupo gB1 y gB3, por eso los genotipos 1 y 3 tienen 10 y 11 casos respectivamente

En los 7 pacientes diagnosticados mediante las tarjetas de pruebas metabólicas, se detectaron gB1(n = 2), gB2 (n = 2) y gB3 (n = 3). No estuvieron disponibles las cargas virales de los pacientes asignados al genotipo gB2. La media (\pm DE) y mediana (RI) de las cargas virales para el genotipo gB1 fue 8020 ó $3.90\log_{10}$ (\pm 8145,87 ó $3.91\log_{10}$) copias/ml y 8020 ó $3.90\log_{10}$ (5140 ó $3.71\log_{10}$ - 10900 ó $4.03\log_{10}$) copias/ml. La media (\pm DE) y/o mediana (RI) de las cargas virales para el genotipo gB3 fue 3440,66 ó $3.53\log_{10}$ (\pm 1568,07 ó $3.19\log_{10}$) copias/ml y 3458 ó $3.53\log_{10}$ (2661 ó $3.42\log_{10}$ - 4229 ó $3.62\log_{10}$). No hubo diferencias estadísticas significativas entre las medias y/o medianas de las cargas virales de los genotipos gB1 y gB3 ($p = 0.37$).

Las diferentes características clínicas estudiadas en las embarazadas con diagnóstico prenatal de infección congénita atendiendo al genotipo de glicoproteína B, son mostradas en la **Tabla 18**. El 60% de las gestantes pertenecientes al genotipo gB1 habían tenido embarazos previos, el 40% de los fetos infectados hallazgos extracerebrales, el 60% de hallazgos cerebrales, y el 60% de las gestantes decidieron interrumpir su embarazo. El 75% de las gestantes pertenecientes al genotipo gB2 habían tenido embarazos previos, el 75% de los fetos infectados mostraron hallazgos cerebrales y extracerebrales, y el 50% de las embarazadas recibieron tratamiento. El 60% de las mujeres pertenecientes al genotipo gB3 fueron primigestas, el 80% de los fetos infectados presentaron hallazgos extracerebrales y el 100% hallazgos cerebrales, y el 80% de las gestantes puso fin a su embarazo. La única paciente con genotipo gB4 había tenido un embarazo previo, el feto presentó hallazgos cerebrales y extracerebrales, y la gestante decidió interrumpir la

gestación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las variables estudiadas atendiendo a los diferentes genotipos de gB.

Características	Glicoproteína B genotipo 1 (n = 5) ^a			Glicoproteína B genotipo 2 (n = 4) ^a			Glicoproteína B genotipo 3 (n = 5) ^b			Glicoproteína B genotipo 4 (n = 1)		
	Número (%)	OR (IC 95%)	P	Número (%)	OR (IC 95%)	P	Número (%)	OR (IC 95%)	P	Número (%)	OR (IC 95%)	P
Antecedentes obstétricos												
Edad (media, DE) años	27,6 (± 6,65)		0.19	30,7 (± 6,18)		0.85	30,25 (± 4,71)		0.97	36 (± 0)		0.21
Edad (mediana, RI) años	29 (24 - 33)			30 (27 - 34,5)			29,5 (26,5 - 34,5)			36 (-)		
Hallazgos extracerebrales												
Afectación Cardíaca	2 (40)	1,30 (0,07 - 20,23)	0.62	1 (25)	0,52 (0,007 - 9,80)	0.54	3 (60)	4,57 (0,29 - 99,47)	0.20	0 (0)	-	0.64
Cardiomegalia	3 (60)	0,76 (0,04 - 14,06)	0.62	3 (75)	1,90 (0,10 - 130,85)	0.54	2 (40)	0,21 (0,01 - 3,34)	0.20	1 (100)	-	0.64
Derrame pericárdico	2 (40)	0,15 (0,001 - 4,26)	0.20	3 (75)	-	0.41	4 (80)	1,30 (0,05 - 98,06)	0.68	1 (100)	-	0.76
Afectación hepática	2 (40)	0,31 (0,01 - 7,04)	0.35	2 (50)	0,86 (0,03 - 67,23)	0.70	4 (80)	2,24 (0,11 - 156,99)	0.48	1 (100)	-	0.69
Esplenomegalia	1 (20)	0,11 (0,001 - 2,38)	0.11	2 (50)	1,30 (0,05 - 98,06)	0.68	4 (80)	3,59 (0,20 - 245,34)	0.31	1 (100)	-	0.61
Ascitis	1 (20)	1,15 (0,01 - 31,66)	0.70	0 (0)	-	0.41	2 (40)	4,09 (0,15 - 313,74)	0.31	0 (0)	-	0.76
Afectación intestinal	2 (40)	0,31 (0,01 - 7,04)	0.35	2 (50)	0,86 (0,03 - 67,23)	0.70	4 (80)	2,24 (0,11 - 156,99)	0.48	1 (100)	-	0.69
Afectación pulmonar	1 (20)	1,15 (0,01 - 31,66)	0.70	1 (25)	1,15 (0,01 - 31,66)	0.70	1 (20)	0,76 (0,01 - 19,93)	0.68	1 (100)	-	0.23
Afectación renal	2 (40)	3,13 (0,14 - 76,44)	0.35	1 (25)	1,15 (0,01 - 31,66)	0.70	1 (20)	0,44 (0,006 - 8,50)	0.48	0 (0)	-	0.84
	1 (20)	2,44 (0,02 - 234,99)	0.53	1 (25)	2,44 (0,02 - 234,99)	0.53	0 (0)	-	0.35	0 (0)	-	0.84
	1 (20)	2,44 (0,02 - 234,99)	0.53	1 (25)	3,87 (0,03 - 391,49)	0.42	0 (0)	-	0.35	0 (0)	-	0.84
	0 (0)	-	0.69	0 (0)	-	0.76	0 (0)	-	0.61	1 (100)	-	0.07
Hallazgos cerebrales												
Hipercogitividad periventricular	3 (60)	-	0.30	3 (75)	-	0.76	5 (100)	-	0.61	1 (100)	-	0.92
Placentomegalia	1 (20)	0,23 (0,003 - 4,50)	0.27	2 (50)	-	0.22	3 (60)	1,88 (0,12 - 37,86)	0.50	0 (0)	-	0.50
Quistes	0 (0)	-	0.17	1 (25)	1,15 (0,01 - 31,66)	0.70	3 (60)	8,36 (0,41 - 627,48)	0.11	0 (0)	-	0.69
Ventriculomegalia	0 (0)	-	0.42	1 (25)	6,70 (0,06 - 782,24)	0.31	1 (20)	1,44 (0,01 - 137,09)	0.68	0 (0)	-	0.83
	0 (0)	-	0.14	1 (25)	2,16 (0,02 - 208,87)	0.57	2 (40)	1,59 (0,07 - 34,55)	0.57	1 (100)	-	0.33
Tratamiento recibido												
Interrupción voluntaria del embarazo	1 (20)	0,68 (0,009 - 14,33)	0.64	2 (50)	6,51 (0,23 - 529,15)	0.20	1 (20)	0,44 (0,006 - 8,50)	0.48	0 (0)	-	0.69
	3 (60)	1,45 (0,06 - 104,63)	0.64	1 (25)	0,15 (0,001 - 4,26)	0.20	4 (80)	2,24 (0,11 - 156,99)	0.48	1 (100)	-	0.69

a El único genotipo mixto encontrado en embarazadas (gB1+gB2) se ha contabilizado en el grupo gB1 y gB2, por eso los genotipos 1 y 2 tienen 5 y 4 casos, respectivamente

b Tres pacientes pertenecientes al genotipo de glicoproteína gB3 no se encuentran incluidos en la tabla porque no dispuso de ningún dato clínico

En los líquidos amnióticos incluidos, se detectaron los genotipos: gB1 (n = 1), gB2 (n = 2), gB3 (n = 2), gB4 (n = 1), y gB1-gB2 (n = 1). Una de las cargas virales no estuvo disponible (1 gB2). La media (\pm DE) y/o mediana (RI) de la carga viral para el genotipo gB3 fue 16671083,50 ó 7.22log₁₀ (\pm 6174424,59 ó 6.79log₁₀) copias/ml y 16671083,50 ó 7.22log₁₀ (14488094,75 ó 7.16log₁₀ - 18854072,25 ó 7.27log₁₀).

En las sangres fetales incluidas, se detectaron todos los genotipos: gB1 (n = 3), gB2 (n = 1), gB3 (n = 6), y gB4 (n = 1). Comparando las medias (\pm DE) y/o medianas (RI) de los diferentes parámetros analíticos de las sangres fetales para gB1 y gB3 no se encontraron diferencias significativas: leucocitos [14,43 (\pm 17,81) y 4,3 (4,15 - 19,65) $\times 10^3/\mu\text{l}$ vs 9,70 (\pm 8,43) y 5,7 (4,85 - 12,55) $\times 10^3/\mu\text{l}$, p = 0.90], hematíes [2,49 (\pm 0,98) y 2,92 (2,14 - 3,05) $\times 10^6/\mu\text{l}$ vs 2,55 (\pm 0,92) y 2,89 (2,2 - 3,08) $\times 10^6/\mu\text{l}$, p = 0.48], hemoglobina [10,2 (\pm 3,56) y 11,9 (9 - 12,25) g/dl vs 9,93 (\pm 2,51) y 10,2 (8,75 - 11,25) g/dl, p = 0.73], y plaquetas [64,33 (\pm 84,70) y 20 (15,5 - 91) $\times 10^3/\mu\text{l}$ vs 18,33 (\pm 3,78) y 20 (17 - 20,5) $\times 10^3/\mu\text{l}$, p = 0.76] . Dos cargas virales no estuvieron disponibles (1 gB3 y 1 gB4). La media (\pm DE) y/o mediana (RI) de la carga viral para el genotipo gB1 fue 32607,03 ó 4.51log₁₀ (\pm 46607,80 ó 466log₁₀) copias/ml y 11757 ó 4.07log₁₀ (5910,5 ó 3.77log₁₀ - 48878,5 ó 4.68log₁₀) copias/ml. La media (\pm DE) y/o mediana (RI) de la carga viral para el genotipo gB3 fue 925246,2 ó 5.96log₁₀ (\pm 1454413,13 ó 6.16log₁₀) copias/ml y 145781 ó 5.16log₁₀ (123845 ó 5.09log₁₀ - 895805 ó 5.95log₁₀) copias/ml. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias y/o medianas de las cargas virales de las sangres fetales pertenecientes a gB1 y gB3 (p = 0.10).

4.3.1.2 Glicoproteína B en infección adquirida

La distribución de los genotipos de glicoproteína B de las muestras de infección adquirida se encuentra representada en la **Figura 24**. Todos los genotipos de glicoproteína B (gB1, gB2, gB3, gB4) fueron detectados, y a todos se le pudo asignar un genotipo. El genotipo de glicoproteína B más prevalente fue gB1 (52.5%), seguido de gB2 (22.5%), gB3 (12.5%), y gB4 (2.5%). Se detectaron 4 muestras con genotipos mixtos (10%): 2 gB1-gB4 y 2 gB1-gB2.

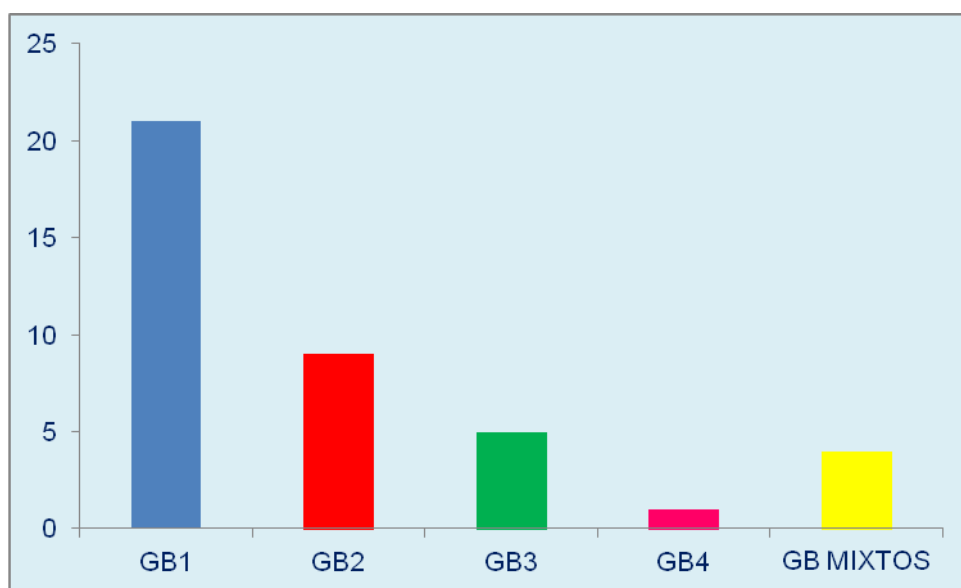


Figura 24. Distribución de los genotipos de glicoproteína B en niños con infección adquirida

Cuando se estudiaba el patrón estacional de los genotipos en períodos de 3 años, se observó que todos los genotipos circularon a lo largo de los años, a excepción de gB2 y gB3 en 2002-2004 y gB4 entre los años 2002-2004 y 2008-2013 como genotipos únicos, aunque gB2 y gB4 estuvieron presentes como genotipos mixtos (**Figura 25**).

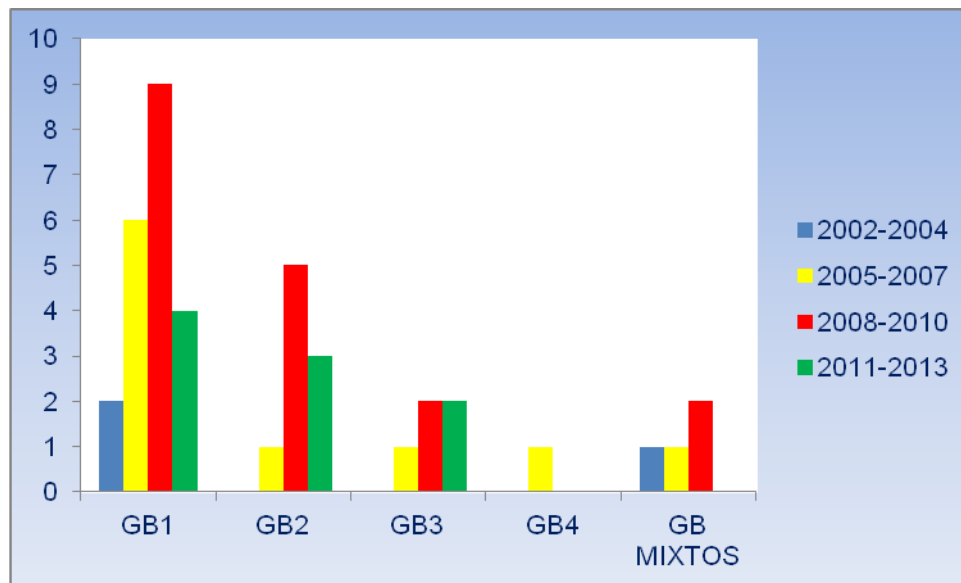


Figura 25. Distribución de los genotipos de glicoproteína B de infección adquirida en función del periodo estudiado

Cuando se comparaban ambas poblaciones, infección congénita e infección adquirida, se pudo observar que el genotipo 3 de glicoproteína B era más frecuente en infección congénita ($p = 0.01$), mientras que el genotipo 1 de glicoproteína B era más frecuente en infección adquirida ($p = 0.01$). En cuanto al resto de genotipos, 2 y 4, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de distribución ($p = 0.73$ y $p = 0.19$) ([Figura 26](#), [Figura 27](#)). La presencia de genotipos mixtos fue más frecuente en infección adquirida, pero no fue estadísticamente significativo ($p=0.20$).

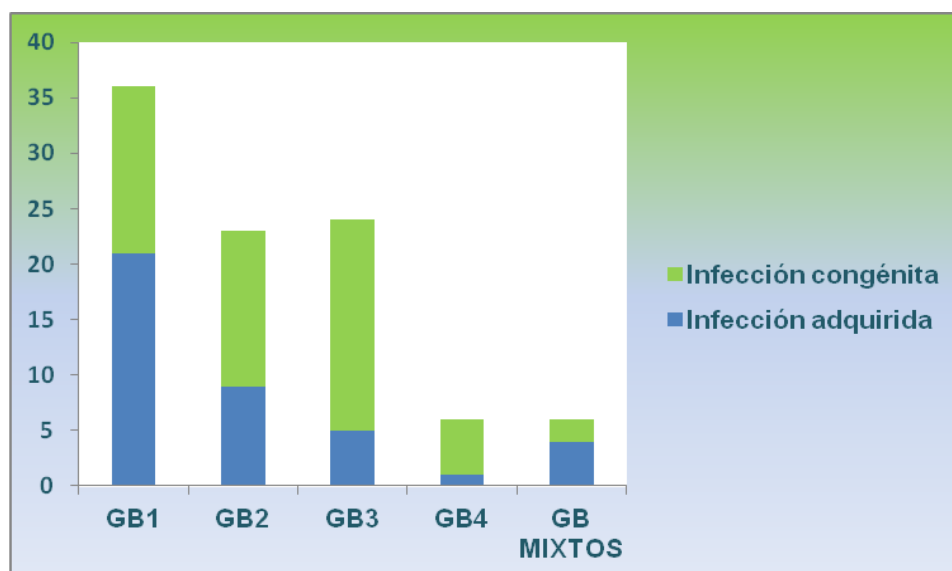


Figura 26. Distribución de los genotipos de glicoproteína B en niños con infección congénita y adquirida

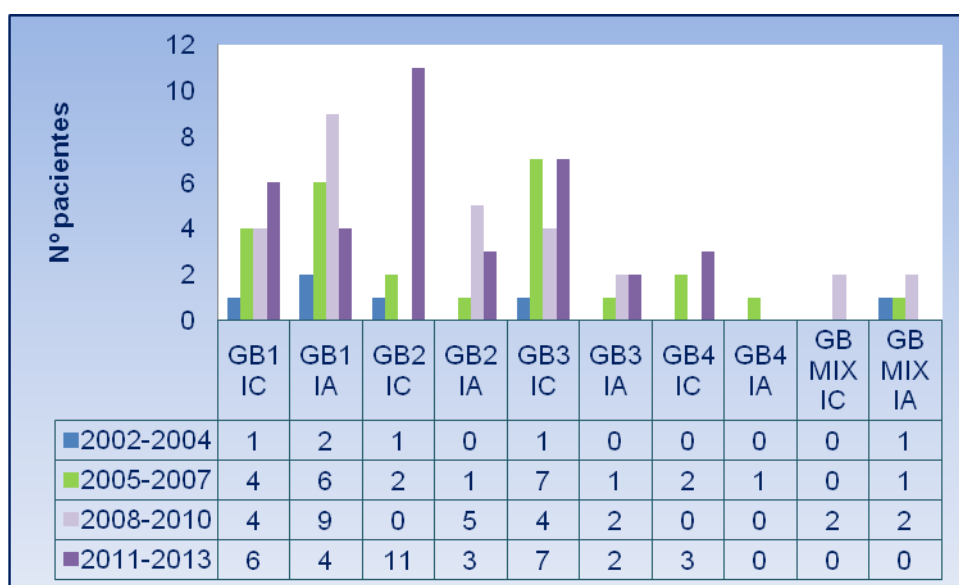


Figura 27. Distribución de los genotipos de glicoproteína B en función del periodo estudiado de infección congénita e infección adquirida

4.3.1.3 Glicoproteína B en pacientes trasplantados

Todos los genotipos de glicoproteína B (gB1, gB2, gB3, gB4) fueron detectados. No se pudo asignar el genotipo en dos (1.2%) muestras de 2 pacientes debido a un resultado repetido de amplificación negativa. La distribución de los genotipos de glicoproteína B de las muestras de infección por CMVh en trasplante fue: gB1 (38.9%), gB2 (26.5%), gB3 (24.7%) y gB4 (1.8%). Se detectaron 11 genotipos mixtos (6.8%) en 11 muestras de 6 pacientes: 5 gB1-gB2, 3 gB1-gB4, y 3 gB2-gB4.

No en todos los casos estudiados en los que los pacientes aportaban más de una muestra (51.6%), se detectaron los mismos genotipos. En 14 (43.7%) pacientes de los 32 que aportaron más de una muestra, el genotipo detectado era el mismo: 4 pacientes con 2 muestras cada uno con gB1, gB2, gB3 y gB1-gB2; 2 pacientes con 3 muestras con gB1, 1 paciente con 3 muestras con gB3, 5 pacientes con 4 muestras cada uno con gB1, 1 paciente con 4 muestras con gB3, y por último, 1 paciente con 6 muestras con gB2. El resto de pacientes (56.2%) mostraron los genotipos de glicoproteína B representados en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Pacientes trasplantados con más de una muestra en las que se encontraron diferentes genotipos de gB

Paciente	2 muestras	Paciente	3 muestras
87	1 gB1, 1 gB3	168	1 gB2, 1 gB3, 1 gB4
216	1 gB2, 1 gB3	172	2 gB1, 1 gB2
		227	2 gB2, 1 gB3
Paciente	4 muestras	Paciente	5 muestras
96	3 gB3, 1 gB2	166	3 gB2, 2 gB3
150	3 gB1-gB4, 1 gB1	200	4 gB2, 1 gB3
202	3 gB2, 1 gB1	206	4 gB1, 1 gB3
Paciente	6 muestras	Paciente	7 muestras
222	3 gB2, 3 gB3	93	6 gB1, 1 gB2
224	3 gB3, 2 gB2, 1 gB1-gB2	171	4 gB2, 3 gB2-gB4
225	3 gB3, 2 gB1, 1 no detectado	209	3 gB1, 4 gB2
235	3 gB1, 2 gB2, 1 gB3		

Las diferentes variables estudiadas en los pacientes trasplantados atendiendo al genotipo de glicoproteína B vienen descritas en la [Tabla 20](#), así como las medias y/o medianas de antigenemia y carga viral ([Tabla 20](#) y [Figura 28](#)). El genotipo gB1 estuvo asociado a no tener una determinación de anticuerpos anti-CMV IgG pretrasplante positiva ($p = 0.004$), a síndrome viral ($p = 0.01$), y a presentarse la infección por CMVh de manera más anticipada tras el trasplante ($p = 0.02$) que el resto de genotipos. El genotipo gB2 estuvo asociado a síndrome viral ($p = 0.03$), y a presentar mayor carga viral en células que el resto de genotipos ($p = 0.02$). El genotipo gB3 estuvo asociado a tener anticuerpos anti-CMV IgG pretrasplante positivos ($p = 0.01$), a viremia asintomática ($p < 0.001$), y a presentar menor valor de antigenemia ($p = 0.001$), carga viral en células ($p < 0.001$) y plasma ($p = 0.04$) que el resto de genotipos. El genotipo gB4 solamente estuvo asociado a presentar menor carga viral que el resto de genotipos ($p = 0.01$) y el genotipo mixto fue más frecuente en varones ($p=0.01$).

Tabla 20. Relación entre el genotipo de glicoproteína B y las diferentes características clínicas estudiadas en receptores de trasplante																				
Características		Glicoproteína B genotipo 1 (n = 63)					Glicoproteína B genotipo 2 (n = 43)					Glicoproteína B genotipo 3 (n = 40)					Glicoproteína B mixto (n = 11)			
		Número (%)	OR (IC 95%)	P	Número (%)	P	Número (%)	OR (IC 95%)	P	Número (%)	OR (IC 95%)	P	Número (%)	OR (IC 95%)	P	Número (%)	OR (IC 95%)	P		
Edad al diagnóstico	Media (± DE) años	51,85 (± 14,39)			51,90 (± 14,86)			50,35 (± 15,62)			60,66 (± 3,21)			62 (± 7,64)						
	Mediana (RI) años	55 (40 - 65)			56 (39 - 65)			54 (41 - 64)			62 (57 - 63)			60 (58-71)						
Sexo	Masculino	40 (63.5)	3,92 (1,73 - 8,85)	< 0,001	40 (93,02)	0,001	32 (80)	0,79 (0,32 - 1,94)	0,61	3 (100)	-	0,45	5 (45,4)	4,05 (1,16-14,12)	0,01					
	IgG antiCMV positivo pretrasplante	43 (68,25)	0,31 (0,13 - 0,72)	0,004	35 (81,4)	0,67	37 (92,5)	4,26 (1,21 - 14,91)	0,01	3 (100)	-	0,49	11 (100)	-	0,08					
Viremia Asintomática		23 (36,5)	0,43 (0,22 - 0,84)	0,01	15 (34,9)	0,03	31 (77,5)	5,71 (2,47 - 13,19)	< 0,001	3 (100)	-	0,11	8 (72,7)	2,83 (0,64 - 17,22)	0,10					
	Síndrome viral	40 (63,5)	2,30 (1,18 - 4,48)	0,01	28 (65,1)	0,03	9 (22,5)	0,17 (0,07 - 0,40)	< 0,001	0 (0)	-	0,11	3 (27,2)	0,35 (0,05 - 1,54)	0,10					
	Enfermedad	8 (12,7)	1,24 (0,45 - 3,42)	0,67	7 (16,27)	0,23	2 (5)	0,33 (0,03 - 1,53)	0,11	0 (0)	-	0,69	1 (9,1)	0,77 (0,01 - 6,11)	0,64					
Días postrasplante		Media (± DE)	Mediana (RI)	P	Media (±DE)	Mediana (RI)	P	Media (±DE)	Mediana (RI)	P	Media (±DE)	Mediana (RI)	P	Media (±DE)	Mediana (RI)	P	P	P		
		65,57 (± 38,54)	60 (45-70)	0,02	77,04 (± 38,95)	65 (45-110)	0,58	82,77 (± 42,66)	74 (60-120)	0,12	100 (± 70,88)	75 (45-180)	0,27	51,45 (± 14,80)	60 (45-60)	0,09	0,05	0,05		
	Antigenemia (n°c/s/20000 c/s)	48,71 (± 69,06)	12 (2-75)	0,14	47,25 (± 69,61)	12 (3-56)	0,37	19,25 (± 46,70)	2 (0-12)	0,001	20,66 (± 35,79)	0 (0-62)	0,60	55,36 (± 85,65)	6 (0-159)	0,45	0,02	0,02		
	Copias log ₁₀ (10 ³ células)	3,96 (± 0,85)	3,97 (3,27-4,60)	0,14	4,10 (± 1,34)	4,05 (3,27-5,07)	0,02	3,01 (± 1,50)	3,18 (2,27-4,22)	< 0,001	3,34 (± 0,35)	3,35 (2,99-3,70)	0,59	3,87 (± 0,87)	3,63 (3,36-4,48)	0,72	0,002	0,002		
	Copias log ₁₀ /ml plasma	4,15 (± 0,98)	4,23 (3,64-4,98)	0,10	4,17 (± 1,36)	4,12 (3,68-4,79)	0,22	3,67 (± 1,03)	3,61 (3,01-4,43)	0,04	2,27 (± 2,09)	2,69 (0-4,12)	0,01	3,49 (± 1,51)	3,44 (2,68-4,46)	0,18	0,01	0,01		

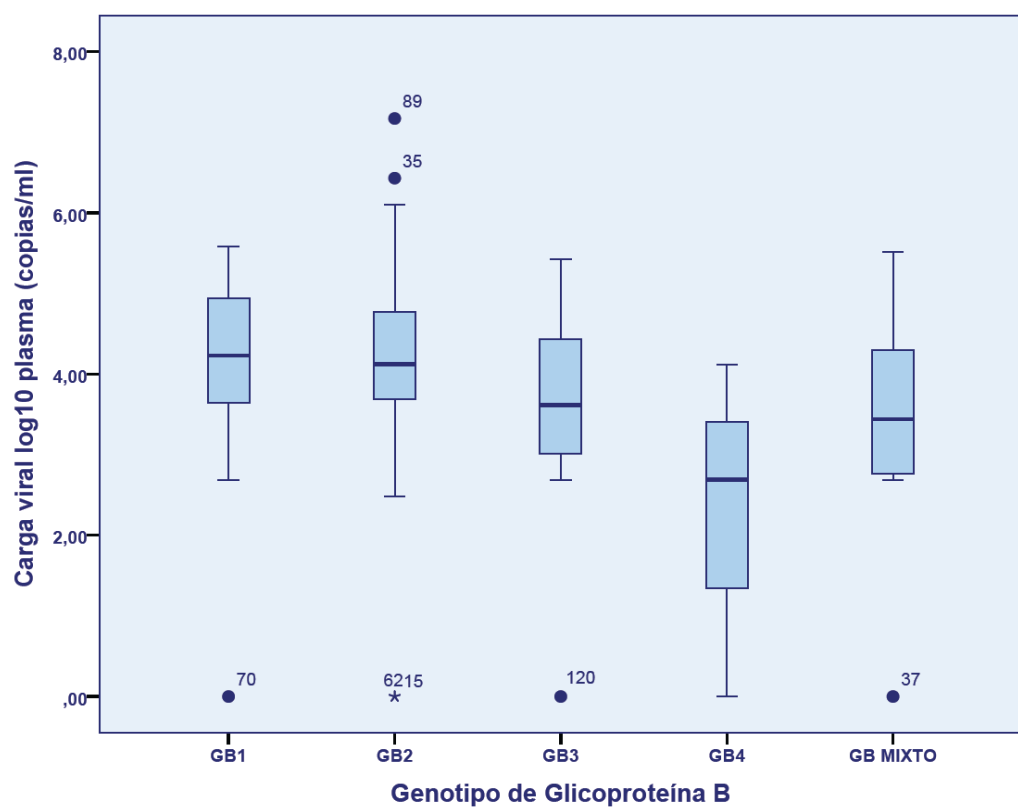
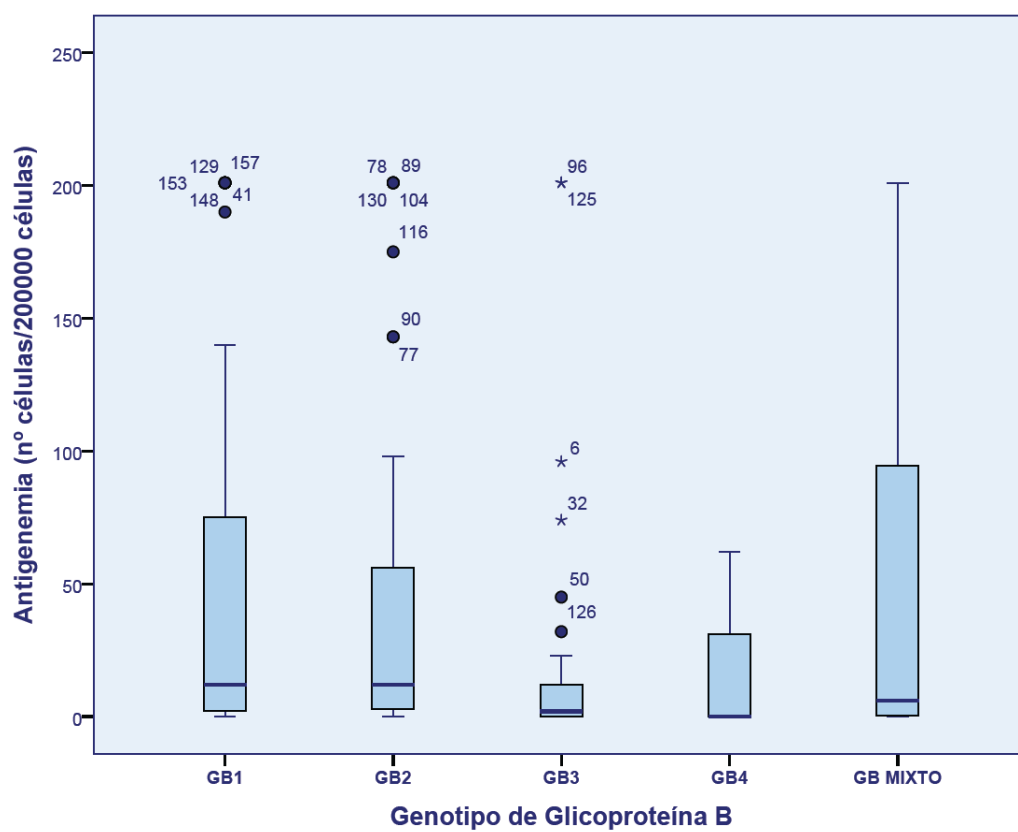


Figura 28. Medianas de la antigenemia, carga viral en plasma y carga viral en células atendiendo al genotipo de glicoproteína B.

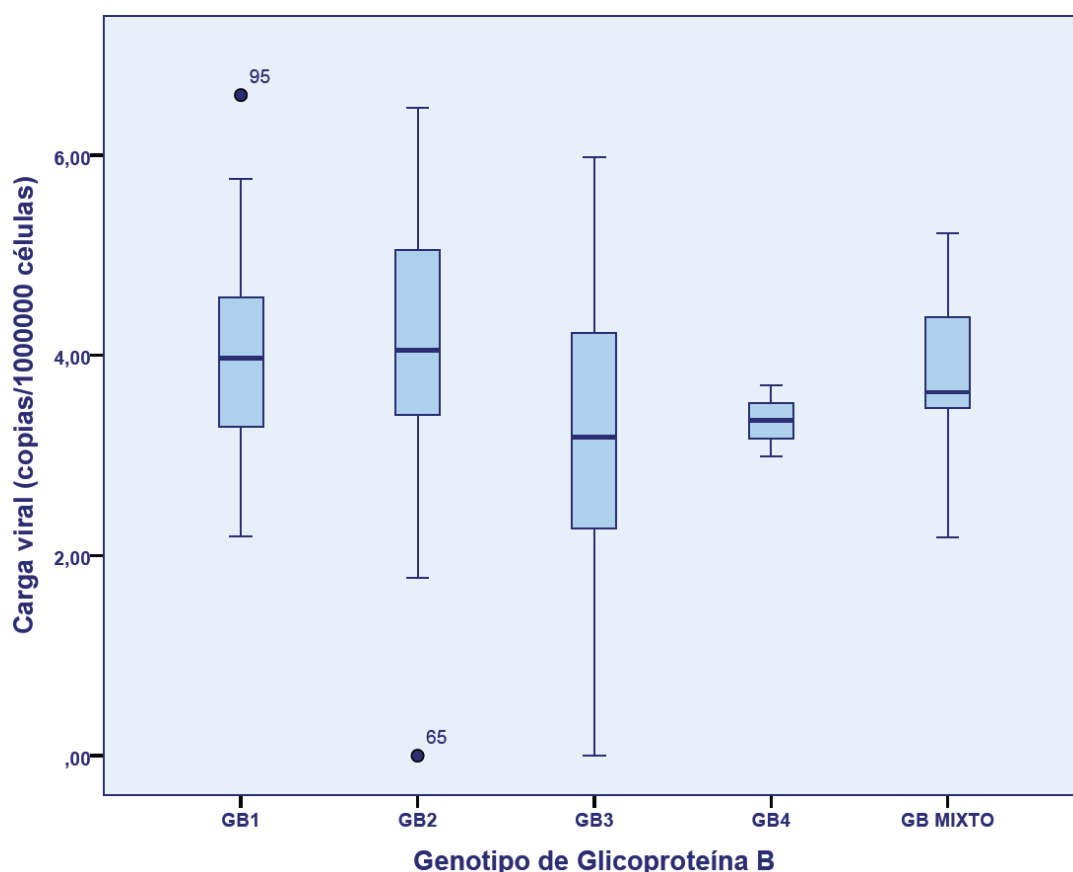


Figura 28 (continuación). Medianas de la antigenemia, carga viral en plasma y carga viral en células atendiendo al genotipo de glicoproteína B.

4.3.2 GLICOPROTEÍNA H

4.3.2.1 Glicoproteína H en infección congénita

Todos los genotipos de glicoproteína H (gH1, gH2) fueron detectados. En todos los casos estudiados en los que los pacientes aportaban más de una muestra, se detectaron los mismos genotipos. Solamente en una muestra perteneciente a un paciente no se pudo asignar el genotipo de glicoproteína H (1.8%) debido a un resultado repetido de amplificación negativa.

La distribución de los genotipos de glicoproteína H de las muestras de infección congénita se encuentra representada en la [Figura 29](#). En global, cuando se tomaba una muestra por paciente, el genotipo de glicoproteína H

más prevalente fue gH1 (55.35%) seguido de gH2 (41.07%) (**Figura 29A**). Sin embargo, cuando las muestras eran estratificadas por tipo de paciente como niños o embarazadas, la prevalencia era algo diferente. En niños, el genotipo más prevalente era gH2 (53.84%), seguido de gH1 (41.02%) (**Figura 29B**). Mientras en embarazadas, el genotipo más frecuentemente encontrado fue gH1 (88.23%), seguido de gH2 (11.76%) (**Figura 29C**). Se detectó en un niño (1.8%) una infección por ambos genotipos (gH1-gH2).

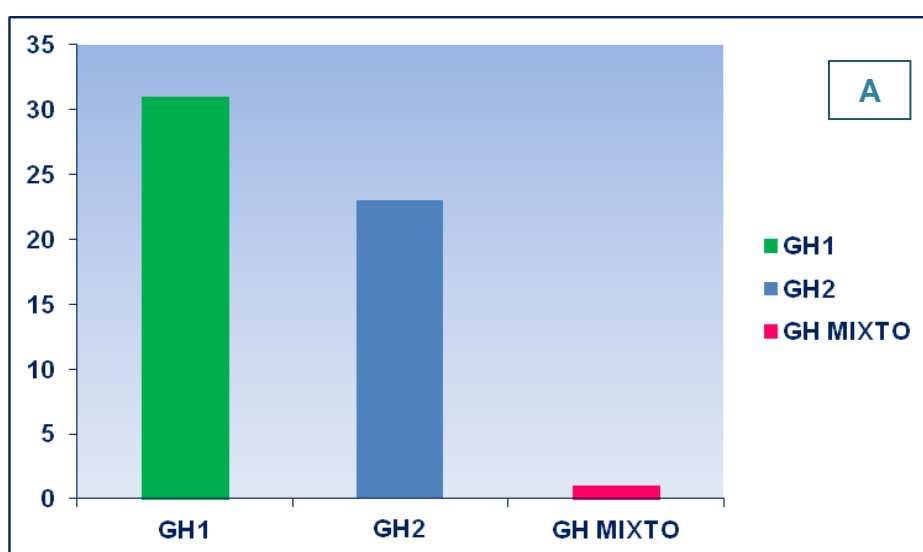


Figura 29. Distribución de los genotipos de glicoproteína H en muestras de infección congénita. A: Global. B: Niños. C: Embarazadas

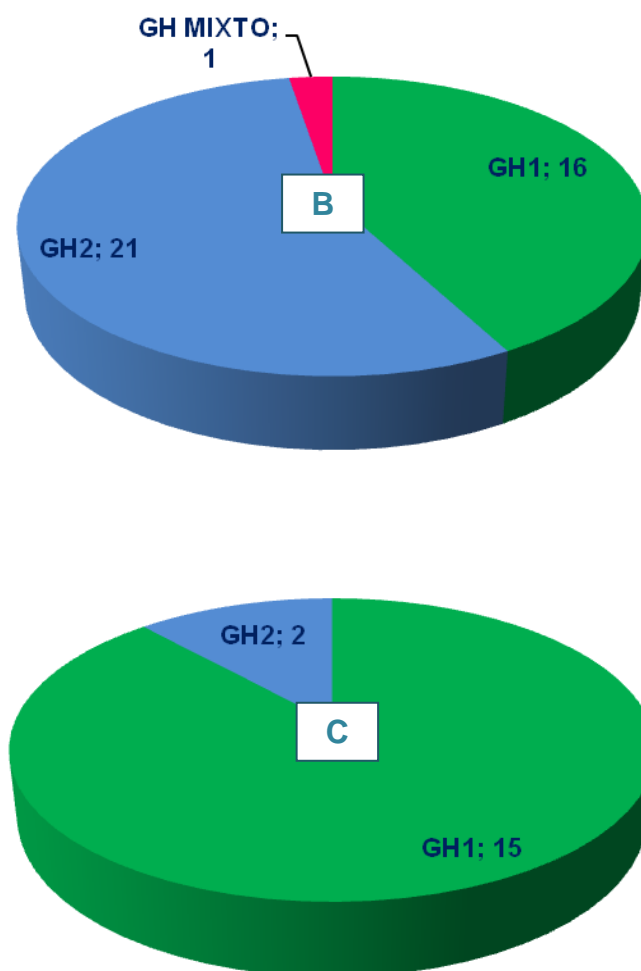


Figura 29 (continuación). Distribución de los genotipos de glicoproteína H en muestras de infección congénita. A: Global. B: Niños. C: Embarazadas

Cuando se estudiaba el patrón estacional de los genotipos en períodos de 3 años, se observó que todos los genotipos circularon a lo largo de los años, a excepción de gH2 entre los años 2002-2004 (**Figura 30**). Los períodos de tiempo comprendidos entre 2005-2007 y 2011-2013 concentraron el mayor número de detecciones.

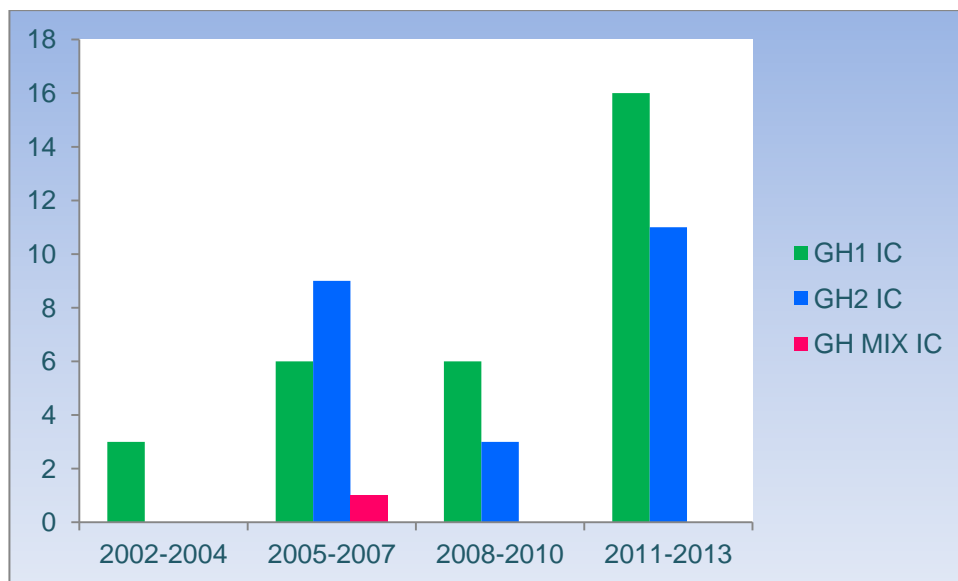


Figura 30. Distribución de los genotipos de glicoproteína H en función del año de diagnóstico de infección congénita

Relación entre los genotipos de glicoproteína H y las diferentes variables estudiadas

Las medias (\pm DE) y/o medianas (RI) de los diferentes parámetros analíticos atendiendo al diferente genotipo de glicoproteína H vienen descritas en la **Tabla 21** y representadas en los gráficos de la **Figura 31**. No hubo diferencia entre las medias y/o medianas de leucocitos ($p = 0.10$), hematíes ($p = 0.24$), hemoglobina ($p = 0.30$), plaquetas ($p = 0.37$), GPT ($p = 0.51$), GOT ($p = 0.83$), GGT ($p = 0.11$), bilirrubina directa ($p = 0.62$), bilirrubina total ($p = 0.28$), y albúmina ($p = 0.12$) entre los diferentes genotipos de glicoproteína H.

Tabla 21. Parámetros analíticos y su relación con el genotipo de glicoproteína H en los niños con infección congénita				
	Glicoproteína H genotipo 1		Glicoproteína H genotipo 2	
Parámetro (unidades)	Media (\pm DE)	Mediana (RI)	Media (\pm DE)	Mediana (RI)
Leucocitos (x 1000/ μ l)	13914,54 (\pm 6801,88)	12060 (9010 - 15700)	9522 (\pm 2775,23)	9405 (7170 - 12160)
Hematíes (x 10 ⁶ / μ l)	4,26 (\pm 0,74)	4,08 (3,90 - 4,54)	3,81 (\pm 0,94)	3,62 (3 - 4,66)
Hemoglobina (g/dl)	15,14 (\pm 2,93)	14,8 (13,4 - 18,4)	13,62 (\pm 3,67)	12,4 (10,1 - 16,7)
Plaquetas (x 1000/ μ l)	216, 54 (\pm 124,07)	232 (116- 315)	279,8 (\pm 19,07)	208 (171 - 265)
Enzimas hepáticas				
GPT (U/l)	22,70 (\pm 6,70)	23,5 (28 - 59)	27,80 (\pm 25,75)	18 (13 - 33)
GOT (U/l)	24,43 (\pm 24,43)	48,5 (42 - 78)	76,22 (\pm 90,72)	52 (41 - 62)
GGT (U/l)	138,63 (\pm 173,01)	106 (25 - 178)	163 (\pm 76)	188 (93 - 212)
Bilirrubina total (mg/dl)	5,69 (\pm 5,27)	3,60 (0,36 - 9,7)	2,19 (\pm 1,46)	2,15 (0,95 - 3,37)
Bilirrubina directa (mg/dl)	0,83 (\pm 0,52)	0,63 (0,62 - 1,33)	1,22 (0,75)	0,99 (0,78 - 1,65)
Albúmina (g/dl)	4,38 (\pm 1,19)	4,09 (3,57 - 4,47)	3,70 (\pm 0,25)	3,8 (3,4 - 3,84)

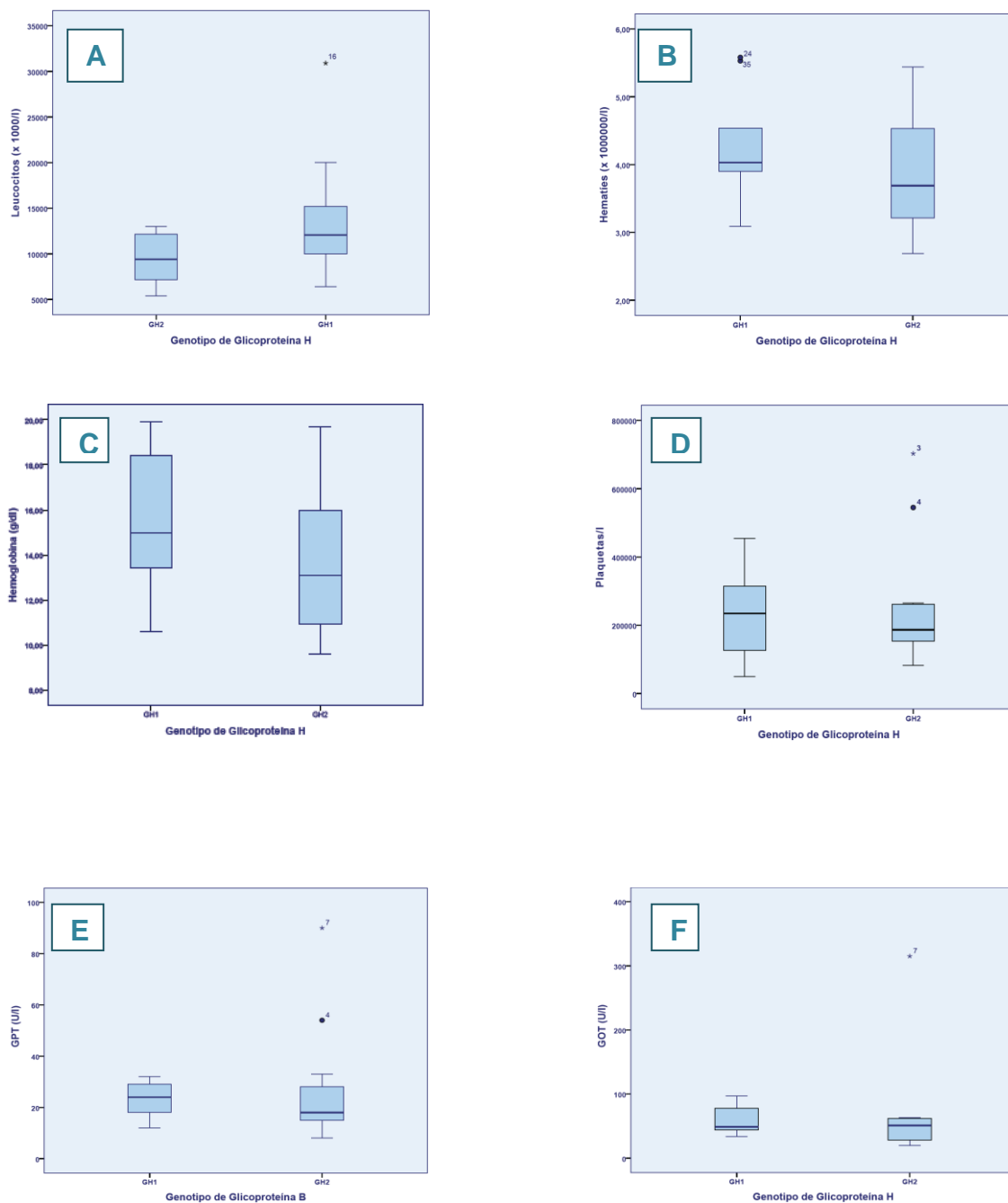


Figura 31. Parámetros analíticos atendiendo a los diferentes genotipos de glicoproteína H en los niños con infección congénita. A: Leucocitos, B: Hematíes, C: Hemoglobina, D: Plaquetas, E: GPT, F: GOT, g: GGT, H: Bilirrubina total, I: Bilirrubina directa, J: Albúmina

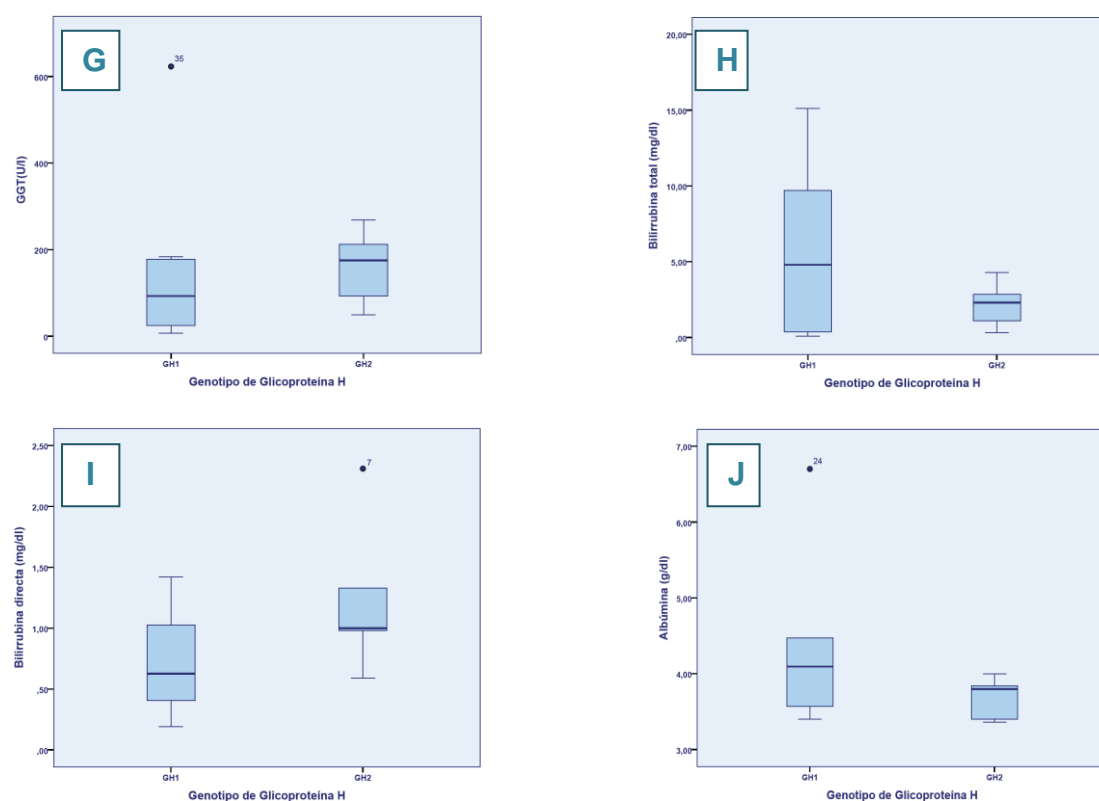


Figura 31 (continuación). Parámetros analíticos atendiendo a los diferentes genotipos de glicoproteína H en los niños con infección congénita. A: Leucocitos, B: Hematíes, C: Hemoglobina, D: Plaquetas, E: GPT, F: GOT, g: GGT, H: Bilirrubina total, I: Bilirrubina directa, J: Albúmina

Las características clínicas estudiadas en los niños con infección congénita atendiendo al genotipo de glicoproteína H son mostradas en la **Tabla 22**. El 86.6% de los pacientes con genotipo gH1 fueron sintomáticos, el 60% presentaron afectación neurosensorial, el 53.3% afectación comunicativa, el 40% afectación motora, el 60% pruebas de imagen alteradas y el 60% recibió tratamiento. El 77.7% de los pacientes con gH2 fueron sintomáticos, el 72.2% afectación neurosensorial, el 33.3% afectación comunicativa, el 27.7% afectación motora, el 55.5% pruebas de imagen alteradas y el 33.3% recibió tratamiento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las variables estudiadas y los diferentes genotipos, salvo con el genotipo gH2, en el cual fue más frecuente la afectación ocular ($p = 0.01$).

Tabla 22. Relación entre el genotipo de glicoproteína H y las características clínicas en niños con infección congénita						
Características	Glicoproteína H genotipo 1 (n = 15) ^a			Glicoproteína H genotipo 2 (n = 18) ^a		
	P			P		
Edad al diagnóstico						
Mediana (RI) días	5 (2 -71)			10 (3 -19)		
	Número (%)	OR (IC 95%)	P	Número (%)	OR (IC 95%)	P
Sexo						
Femenino	11 (73)	1,66 (0,44 - 6,19)	0.44	11 (61.1)	0,45 (0,11 - 1,74)	0.24
Sintomático	13 (86.6)	1,48 (0,14 - 20,51)	0.53	14 (77.7)	0,78 (0,05 - 8,09)	0.59
Asintomático	2 (5.12)	0,67 (0,04 - 6,95)	0.53	3 (16.6)	1,27 (0,12 - 17,68)	0.59
Hepatoesplenomegalia	2 (13.3)	-	0.19	0 (0)	-	0.16
Rash petequeial	2 (13.3)	2,58 (0,12 - 166,97)	0.42	1 (5.5)	0,33 (0,005 - 7,17)	0.37
Retraso crecimiento uterino	2 (13.3)	0,31 (0,02 - 2,24)	0.17	6 (33.3)	2,68 (0,38 - 32,28)	0.23
Afectación neurosensorial	9 (60)	0,38 (0,02 - 3,43)	0.28	13 (72.2)	3,10 (0,35 - 41,92)	0.21
Auditiva	8 (53.3)	1,00 (0,20 - 4,85)	1.00	8 (44.4)	0,67 (0,09 - 4,25)	0.46
Hipoacusia bilateral	4 (26.6)	0,72 (0,10 - 4,75)	0.50	5 (27.7)	1,10 (0,16 - 7,75)	0.61
Hipoacusia unilateral	4 (26.6)	1,45 (0,18 - 12,85)	0.50	3 (16.6)	0,55 (0,06 - 4,35)	0.40
Ocular	1 (6.6)	0,16 (0,002 - 1,80)	0.09	6 (33.3)	-	0.01
Afectación comunicativa	8 (53.3)	2,66 (0,59 - 12,04)	0.19	6 (33.3)	0,51 (0,11 - 2,27)	0.37
Afectación motora	6 (40)	2,01 (0,33 - 13,30)	0.29	5 (27.7)	0,72 (0,15 - 3,38)	0.68
Afectación neurológica	4 (26.6)	0,88 (0,13 - 5,49)	0.59	5 (27.7)	0,93 (0,14 - 6,21)	0.62
Microcefalia	3 (20)	1,28 (0,14 - 11,82)	0.56	3 (16.6)	0,77 (0,08 - 7,09)	0.56
Pruebas de imagen alteradas	9 (60)	0,90 (0,19 - 4,16)	0.89	10 (55.5)	0,74 (0,11 - 4,44)	0.50
Alteración de la sustancia blanca	4 (26.6)	0,61 (0,09 - 3,60)	0.39	6 (33.3)	1,33 (0,22 - 8,72)	0.50
Calcificaciones cerebrales	0 (0)	-	0.50	1 (5.5)	-	0.53
Calcificaciones periventriculares	3 (20)	1,60 (0,15 - 22,70)	0.50	2 (11.1)	0,52 (0,03 - 5,53)	0.42
Calcificaciones de las arterias estriadas	1 (6.6)	0,51 (0,007 - 10,98)	0.52	2 (11.1)	1,68 (0,07 - 109,43)	0.58
Leucoencefalopatía	1 (6.6)	0,37 (0,006 - 5,30)	0.37	3 (16.6)	2,33 (0,16 - 136,31)	0.43
Quistes periventriculares/matriz germinal	4 (26.6)	2,51 (0,29 - 33,16)	0.29	2 (11.1)	0,32 (0,02 - 2,90)	0.22
Ventriculomegalia	2 (13.3)	2,26 (0,10 - 147,32)	0.47	1 (5.5)	0,37 (0,005 - 8,16)	0.41
Tratamiento	9 (60)	1,80 (0,34 - 9,39)	0.48	6 (33.3)	0,75 (0,14 - 3,82)	0.72

Nota: A uno de los pacientes no se le pudo asignar el genotipo de glicoproteína H. Seis pacientes (2 gH1 y 4 gH2) no se encuentran incluidos en esta tabla porque no se dispuso de ningún dato en la historia clínica

a El único genotipo mixto encontrado en niños (gH1-gH2) se ha contabilizado en el grupo gH1 y gH2, por eso los genotipos 1 y 2 tienen 15 y 18 casos, respectivamente

En los 7 pacientes diagnosticados mediante las tarjetas de pruebas metabólicas se detectaron gH1 (n = 4) y gH2 (n=3). No estuvieron disponibles las cargas virales de 2 pacientes asignados al genotipo 1. La media (\pm DE) y/o mediana (RI) de las cargas virales para gH1 fue 4229 ó $3.62\log_{10}$ (\pm 1090,35 ó $3.03\log_{10}$) copias/ml y 4229 ó $3.62\log_{10}$ [3843,5 ó $3.58\log_{10}$ - 4614.5 ó $3.66\log_{10}$] copias/ml. La media (\pm DE) y/o mediana (RI) de las cargas virales para gH2 fue 25968 ó $3.77\log_{10}$ (\pm 6768,28 ó $3.83\log_{10}$) copias/ml y 2260 ó $3.35\log_{10}$. [2062 ó

$3.31\log_{10} - 8020$ ó $3.90\log_{10}$] copias/ml. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias y/o medianas de las cargas virales de las pruebas de tarjetas metabólicas ($p = 0.22$).

Las diferentes características clínicas estudiadas en las gestantes con diagnóstico prenatal de infección congénita atendiendo al genotipo de glicoproteína H, son mostradas en la **Tabla 23**. El 69.2% de las gestantes con genotipo gH1 habían tenido embarazos previos, el 76.9% de los fetos infectados presentaron hallazgos extracerebrales y el 84.6% hallazgos cerebrales, el 30.7% de las gestantes recibió tratamiento, y el 69.2% decidió interrumpir el embarazo. La gestante con genotipo gH2 fue primigesta, el feto infectado presentó hallazgos cerebrales, y decidió poner fin a su gestación. No se encontraron diferencias significativas entre las diferentes variables estudiadas, salvo en la edad, donde las pacientes de mayor edad pertenecían al genotipo 1 de glicoproteína H.

Tabla 23. Relación entre el genotipo de glicoproteína H y las características clínicas en el diagnóstico prenatal de infección congénita			
Características	Glicoproteína H genotipo 1 (n = 13) ^a	Glicoproteína H genotipo 2 (n = 1) ^a	P
Edad (media, DE) años	31,53 (± 4,34)	21 (± 4,24)	0.005
Edad (mediana, RI) años	31 (28 - 35)	21 (18 - 24)	
	Número (%)	Número (%)	P
Antecedentes obstétricos			
Primigesta	4 (30.7)	1 (100)	0.35
> 2 embarazos	9 (69.2)	0 (0)	0.35
Hallazgos extracerebrales			
Afectación Cardíaca	10 (76.9)	0 (0)	0.23
Cardiomegalia	9 (69.2)	0 (0)	0.30
Derrame pericárdico	8 (61.5)	0 (0)	0.19
Afectación hepática	3 (23.07)	0 (0)	0.76
Esplenomegalia	9 (69.2)	0 (0)	0.30
Ascitis	3 (23.07)	0 (0)	0.76
Afectación intestinal	4 (30.7)	0 (0)	0.69
Afectación pulmonar	2 (15.3)	0 (0)	0.84
Afectación renal	2 (15.3)	0 (0)	0.84
Afectación renal	1 (6.6)	0 (0)	0.92
Hallazgos cerebrales			
Hiperecogenicidad periventricular	11 (84.6)	1 (100)	0.92
Placentomegalia	6 (46.1)	0 (0)	0.50
Quistes	4 (30.7)	0 (0)	0.69
Ventriculomegalia	2 (15.3)	0 (0)	0.83
Ventriculomegalia	4 (30.7)	0 (0)	0.66
Tratamiento recibido			
Interrupción voluntaria del embarazo	4 (30.7)	0 (0)	0.69
	9 (69.2)	1 (100)	0.69

a No se encontraron genotipos mixtos. Tres pacientes (2 gH1 y 1 gH2) fueron excluidas del análisis al no disponer de ningún dato clínico. No se pudieron calcular los Odds Ratio debido a la presencia del valor numérico 0

En los líquidos amnióticos incluidos, se detectaron todos los genotipos: 6 gH1 y 1 gH2. Una de las cargas virales no estuvo disponible (1 gH1). La media (± DE) y/o mediana (RI) de la carga viral para el genotipo gH1 fue 17571232,2 ó 7.24log₁₀ (± 10949125,06 ó 7.03log₁₀) copias/ml y 21037061 ó 7.32log₁₀ (12305106 ó 7.09log₁₀ - 26198086 ó 7.41log₁₀) copias/ml.

En las sangres fetales incluidas, se detectaron todos los genotipos: 10 gH1 y 1 gH2. Las medias (± DE) y/o medianas (RI) de los diferentes parámetros analíticos de las sangres fetales del genotipo 1 de glicoproteína H fueron: leucocitos [10,20 (± 11,29) y 4,62 (4,22 ; 9,12) x 10³/μl], hematíes [2,62 (± 0,75) y 2,90 (2,37 ; 3,16) x 10⁶/μl], hemoglobina [10,42 (± 2,49) y 11,15 (9,47 ; 12,37) g/dl], y plaquetas [57,37 (± 59,79) y 20,5 (18,5 ; 92,7) x 10³/μl]. Dos de

las cargas virales de gH1 no estuvieron disponibles. La media (\pm DE) y/o mediana (RI) de la carga viral para gH1 fue: 572417,63 ó 5.75log₁₀ (\pm 1201585,89 ó 6.07log₁₀) copias/ml y 48878,5 ó 4.68log₁₀ (10800 ó 4.03log₁₀ - 123845 ó 5.09log₁₀) copias/ml.

4.3.2.2 Glicoproteína H en infección adquirida

La distribución de los genotipos de glicoproteína H de las muestras de infección adquirida se encuentra representada en la **Figura 32**. Todos los genotipos de glicoproteína H (gH1, gH2) fueron detectados, y a una (2.5%) de las muestras no se le pudo asignar el genotipo por un resultado repetido de amplificación negativa. El genotipo de glicoproteína H más prevalente fue gH1 (55%) seguido de gH2 (37.5%). Se detectaron 2 muestras con genotipos mixtos gH1-gH2 (5%).

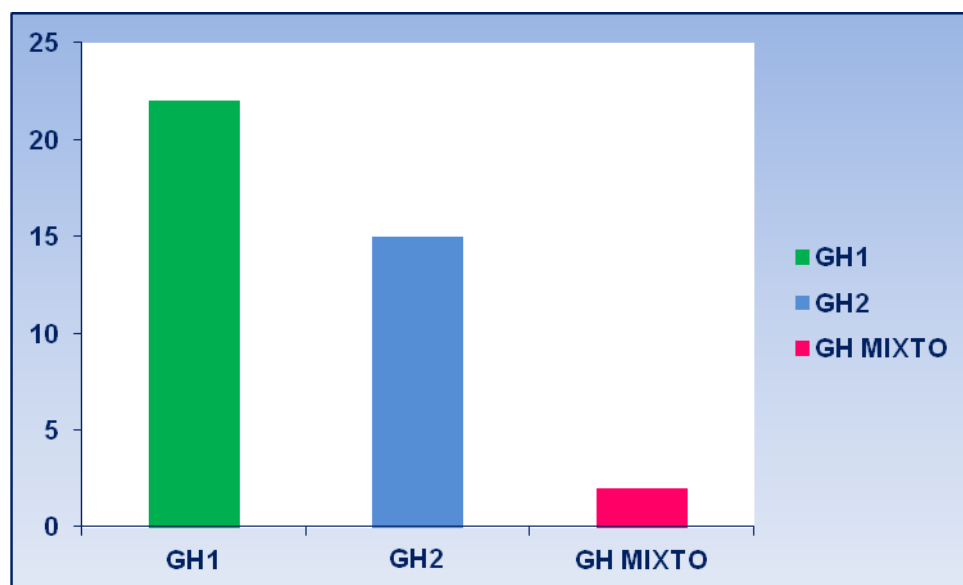


Figura 32. Distribución de los genotipos de glicoproteína H en niños con infección adquirida

Cuando se estudiaba el patrón estacional de los genotipos en períodos de 3 años, se observó que todos los genotipos circularon a lo largo de los años, (**Figura 33**). El genotipo gH1 fue más prevalente entre los años 2008-2013, mientras que en el primer período (2002-2007) el genotipo 2 fue más frecuente.

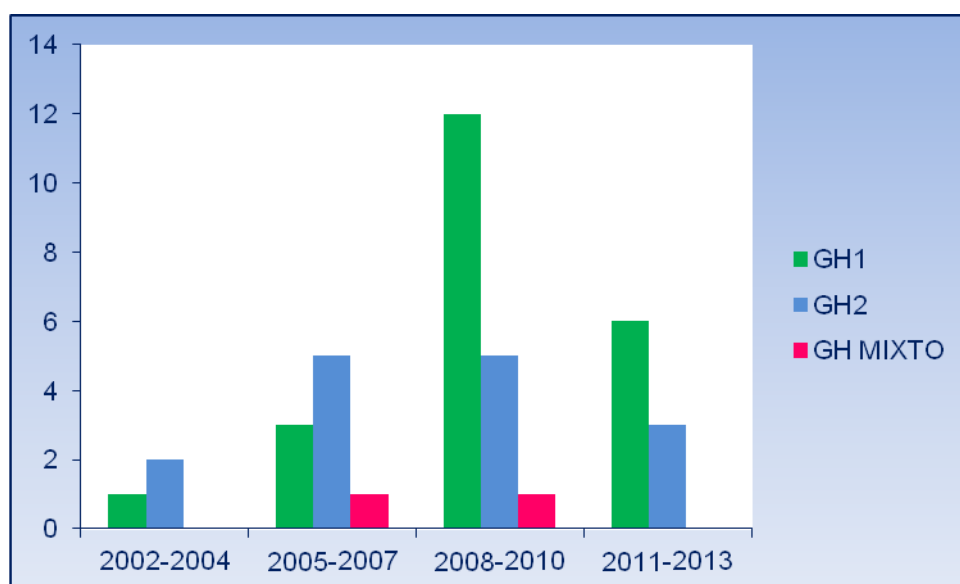


Figura 33. Distribución de los genotipos de glicoproteína H de infección adquirida en función del periodo estudiado

Cuando se comparaban ambas poblaciones, infección congénita e infección adquirida, se pudo observar que tanto los genotipos únicos como los mixtos no predominaban en una determinada población (gH1 $p = 0.99$, gH2 $p=0.74$ y gH1-gH2 $p = 0.37$) (**Figura 34, Figura 35**).

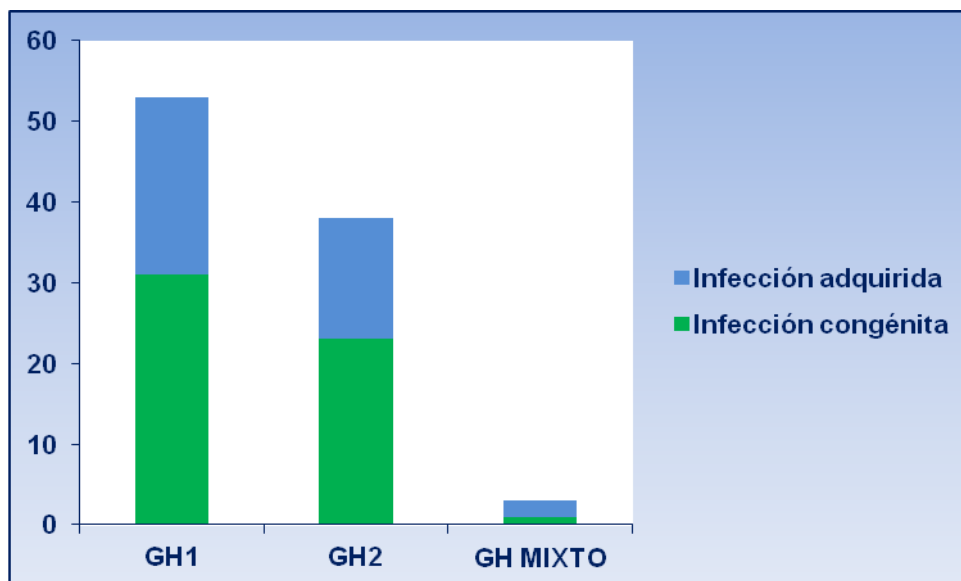


Figura 34. Distribución de los genotipos de glicoproteína H en niños con infección congénita y adquirida

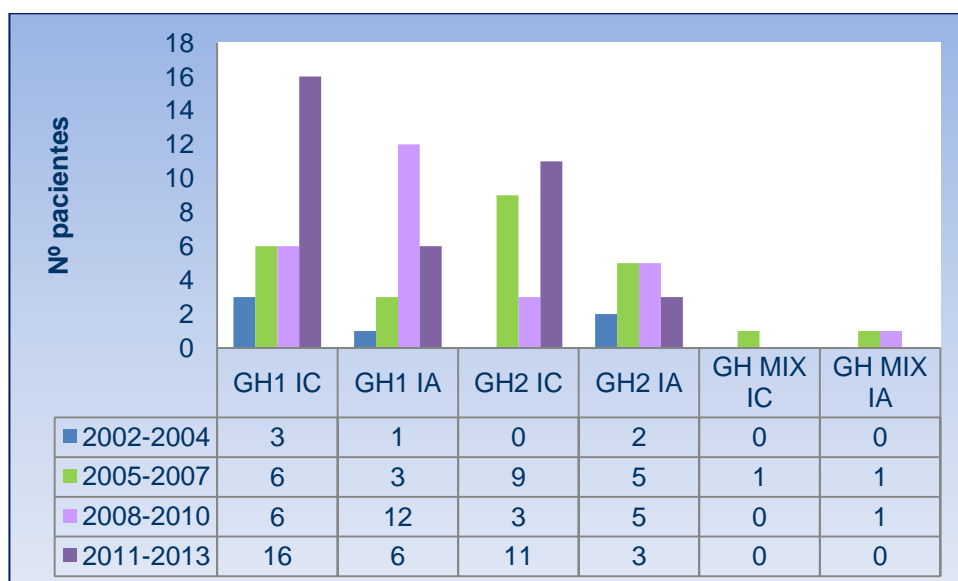


Figura 35. Distribución de los genotipos de glicoproteína H en función del año de diagnóstico de infección congénita e infección adquirida

4.3.2.3 Glicoproteína H en pacientes trasplantados

Todos los genotipos de glicoproteína H (gH1, gH2) fueron detectados. No se pudo asignar el genotipo en 5 (3.08%) muestras de 5 pacientes debido a un resultado repetido de amplificación negativa. La distribución de los genotipos de glicoproteína H de las muestras de infección por CMVh en trasplante fue gH1 (35.8 %) y gH2 (29.62%). Se detectaron 51 genotipos mixtos (31.48 %) en 51 muestras correspondientes a 27 pacientes.

No en todos los casos estudiados en los que los pacientes aportaban más de una muestra (51.6%), se detectaron los mismos genotipos. En 12 (37.5%) pacientes de los 32, el genotipo detectado era el mismo: 1 paciente con 2 muestras con gH1 y otro paciente con gH1-gH2; 2 pacientes con 3 muestras con gH1, 1 paciente con 3 muestras con gH2, 2 pacientes con 4 muestras cada uno con gH2, 1 paciente con 4 muestras con gH1-gH2, 1 paciente con 6 muestras con gH1, 1 paciente con 7 muestras con gH1, 1 paciente con 7 muestras con gH2, y por último, 1 paciente con 7 muestras con gH1-gH2. El resto de pacientes (62.5%) mostraron los genotipos de glicoproteína H representados en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Pacientes trasplantados con más de una muestra en las que se encontraron diferentes genotipos de gH

Paciente	2 muestras	Paciente	3 muestras
87	1 gH1, 1 gH1-gH2	85	1 gH2, 1 no detectado
138	1 gH1, 1 gH1-gH2	172	2 gH1-gH2, 1 gH1
183	1 gH1, 1 gH1-gH2	227	2 gH1, 1 gH1-gH2
253	1 gH1, 1 gH1-gH2		
Paciente	4 muestras	Paciente	5 muestras
150	3 gH1-gH2, 1 gH2	166	3 gH1, 1 gH2, 1gH1-gH2
159	3 gH1, 1 gH2	200	4 gH2, 1 gH1-gH2
202	3 gH1, 1 gH1-gH2	206	4 gH2, 1 gH1
233	2 gH1-gH2, 1 gH2, 1gH1		
234	3 gH2, 1 gH1	Paciente	6 muestras
252	1 gH1-gH2, 2 gH2, 1gH1	222	5 gH1-gH2, 1 gH2
		224	2 gH1-gH2, 2 gH2, 2 gH1
		225	4 gH1-gH2, 1 gH1, 1 no detectado
		235	3 gH1-gH2, 2 gH2, 1 no detectado

Las diferentes variables estudiadas en los pacientes trasplantados atendiendo al genotipo de glicoproteína H vienen descritas en la [Tabla 25](#), así como las medias y/o medianas de antigenemia y carga viral ([Tabla 25](#) y [Figura 36](#)). Dentro de las variables estudiadas, gH1 estuvo asociado a presentar anticuerpos anti-CMV IgG pretrasplante positivos ($p = 0.007$), a viremia asintomática ($p = 0.01$), y a presentarse la infección por CMVh más tarde que con el resto de genotipos ($p < 0.001$). El genotipo gH2 estuvo asociado a no tener una determinación de anticuerpos anti-CMV IgG pretrasplante positiva ($p = 0.004$), a síndrome viral ($p = 0.004$), y a presentar mayor carga viral plasmática que el resto de genotipos ($p = 0.01$). El genotipo mixto gH1-gH2 estuvo asociado a tener anticuerpos anti-CMV IgG pretrasplante positivos ($p = 0.001$), y a presentarse más anticipadamente la infección, tras el trasplante que con el resto de genotipos ($p < 0.001$).

Tabla 25. Relación entre el genotipo de glicoproteína H y las diferentes características clínicas estudiadas en receptores de trasplante												
Características	Glicoproteína H genotipo 1 (n = 58)				Glicoproteína H genotipo 2 (n = 48)				Glicoproteína H mixto (n = 51)			
	Número (%)	OR (IC 95%)	P		Número (%)	OR (IC 95%)	P		Número (%)	OR (IC 95%)	P	
Edad al diagnóstico												
Media (± DE) años	53,55 (± 12,95)				50,87 (± 16,62)				52,43 (± 14,62)			0.64
Mediana (RI) años	57 (48 - 64)				54 (42 - 63)				55 (40 - 66)			
Sexo												
Masculino	50 (86.2)	0,48 (0,19 - 1,22)	0.12		35 (72.9)	2,33 (0,91 - 5,93)	0.07		35 (68.6)	1,64 (0,77 - 3,49)	0.18	
IgG anti-CMV positiva pretrasplante												
	50 (86.2)	3,27 (1,34 - 7,99)	0.007		30 (62.5)	0,27 (0,11 - 0,68)	0.004		48 (94.1)	5,74 (1,65 - 19,92)	0.001	
Viremia Asintomática												
	38 (65.5)	2,63 (1,20 - 5,75)	0.01		19 (39.6)	0,32 (0,14 - 0,70)	0.004		22 (43.1)	0,65 (0,33 - 1,27)	0.21	
Síndrome viral												
	22 (37.9)	0,37 (0,17 - 0,82)	0.01		31 (64.6)	3,10 (1,41 - 6,80)	0.004		29 (56.8)	1,53 (0,78 - 3,00)	0.21	
Enfermedad												
	7 (12.06)	1,45 (0,39 - 5,28)	0.40		5 (10.4)	0,96 (0,27 - 3,36)	0.95		8 (15.7)	1,78 (0,65 - 4,83)	0.24	
	Media (±DE)	Mediana (RI)	P		Media (±DE)	Mediana (RI)	P		Media (±DE)	Mediana (RI)	P	
Días postrasplante	88,90 (± 43,99)	75 (60 - 120)	< 0.001		69,29 (± 38,87)	60 (45 - 80)	0.44		56,35 (± 26,23)	47 (45 - 65)	< 0.001	0.001
Antigenemia (n°cls/20000 cls)	37,60 (± 60,98)	7 (1 - 48)	0.54		44,76 (± 69,84)	6 (1 - 75)	0.68		46,78 (± 73,42)	11 (1 - 48)	0.50	0.60
Copias log₁₀ (10⁶células)	3,67 (± 1,53)	3,63 (2,82 - 4,70)	0.82		3,87 (± 1,14)	4,09 (3,25 - 4,65)	0.33		3,87 (± 1,05)	3,89 (3,20 - 4,28)	0.35	0.82
Copias log₁₀/ml plasma	3,93 (± 1,14)	3,89 (3,15 - 7,17)	0.76		4,31 (± 1,09)	4,40 (3,69 - 7,17)	0.01		3,82 (± 1,33)	4,10 (3,11 - 4,40)	0.28	0.03

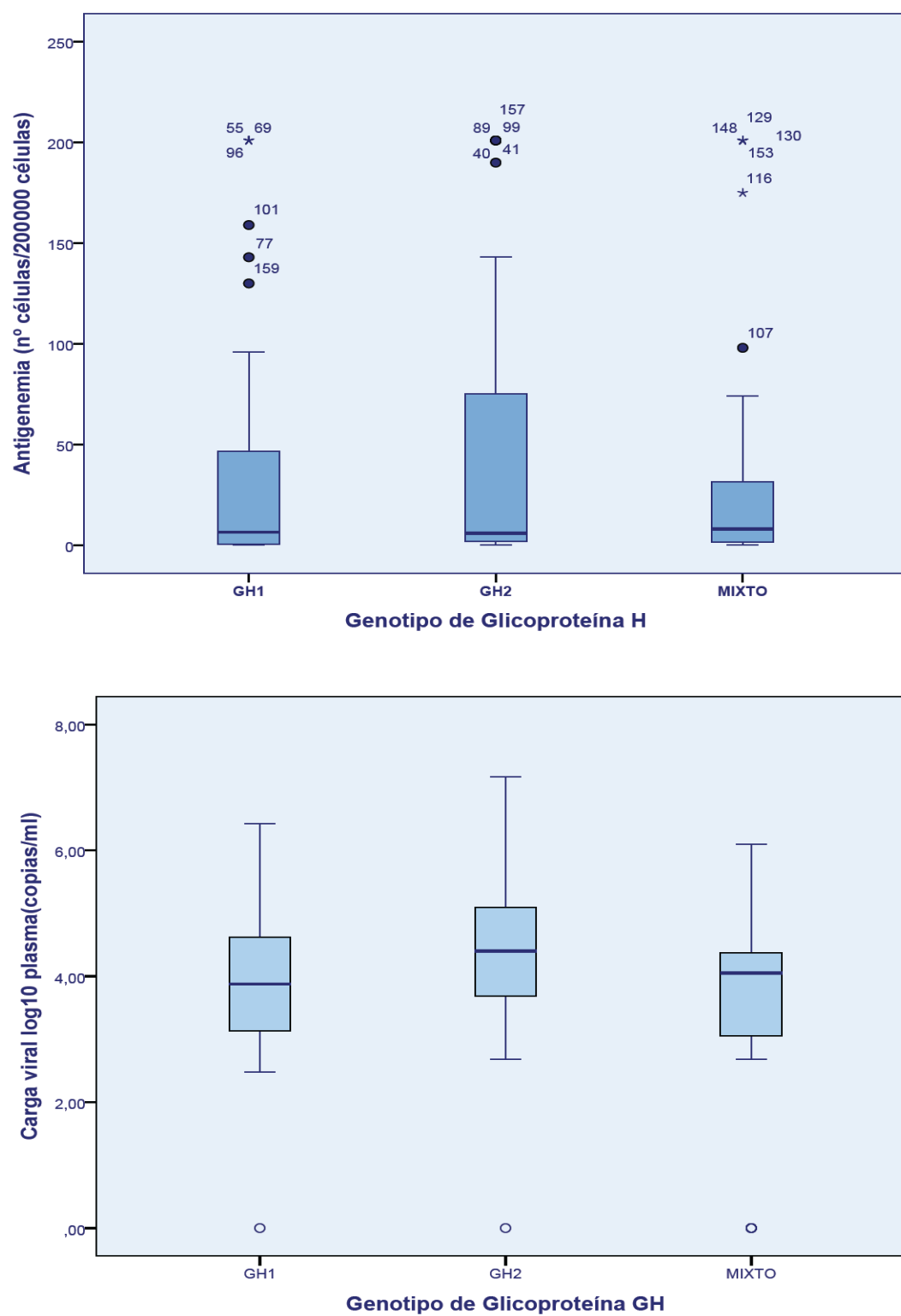


Figura 36. Medianas de la antigenemia, carga viral en plasma y carga viral en células atendiendo al genotipo de glicoproteína H.

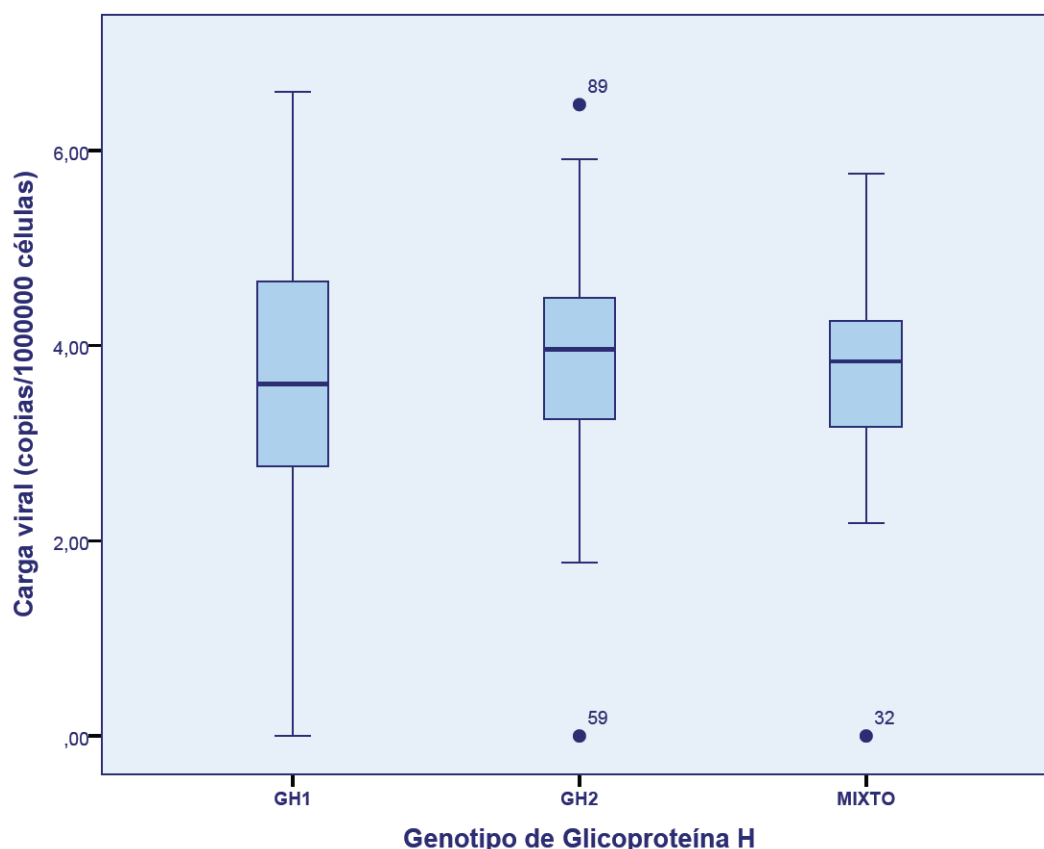


Figura 36 (continuación). Medianas de la antigenemia, carga viral en plasma y carga viral en células atendiendo al genotipo de glicoproteína H.

4.3.3 UL144

4.3.3.1 UL144 en infección congénita

Cuatro de los genotipos de UL144 (A, B, C, A/C) fueron detectados (**Figura 37**). En todos los casos estudiados en los que los pacientes aportaban más de una muestra, se detectaron los mismos genotipos. No se pudo asignar el genotipo de UL144 a 3 (5.35 %) muestras de 3 pacientes, debido a un resultado repetido de amplificación negativa.

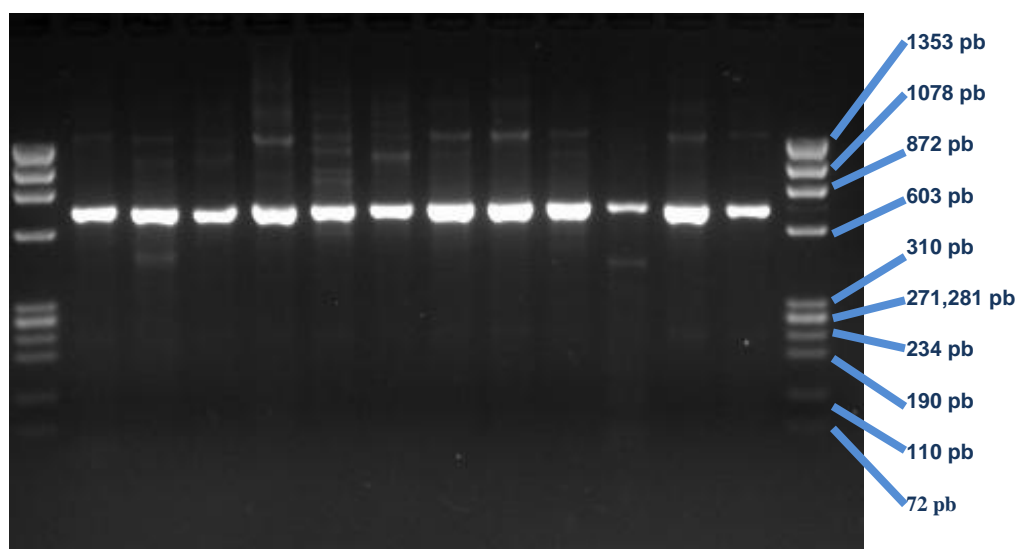


Figura 37. Imagen de electroforesis en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio en el que se puede apreciar el fragmento amplificado de 737 pb de UL144.

La distribución de los genotipos de UL144 de las muestras de infección congénita se encuentra representada en la **Figura 38**. En global, cuando se tomaba una muestra por paciente, el genotipo de UL144 más prevalente era UL144 B (41.50%) seguido de UL144 C (22.64%), UL144 A (20.75%), y UL144 A/C (15.09%) (**Figura 38A**). Cuando las muestras eran estratificadas por tipo de paciente como niños o embarazadas, la distribución seguía el mismo patrón de frecuencia. En niños, el genotipo más prevalente era UL144 B (40.54%), seguido de UL144 C (21.62%), y por último UL144 A y UL144 A/C con la misma frecuencia (18.91%) (**Figura 38B**). En embarazadas, el genotipo más frecuentemente encontrado fue UL144 B (43.75%), seguido de UL144 A y UL144 C con la misma frecuencia (25%), y por último UL144 A/C (6.25%) (**Figura 38C**).

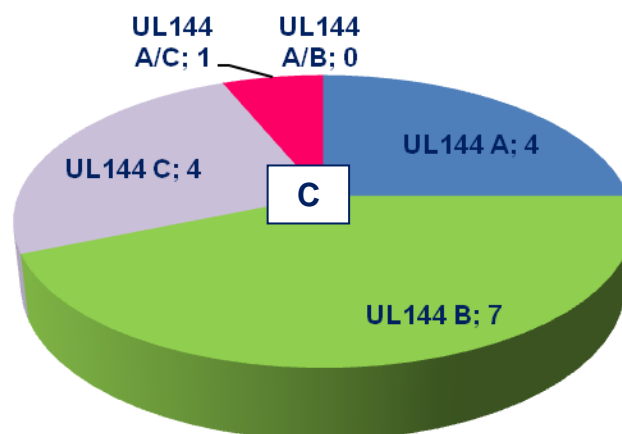
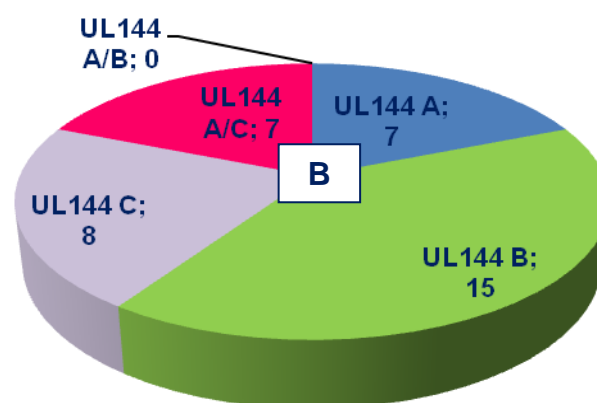
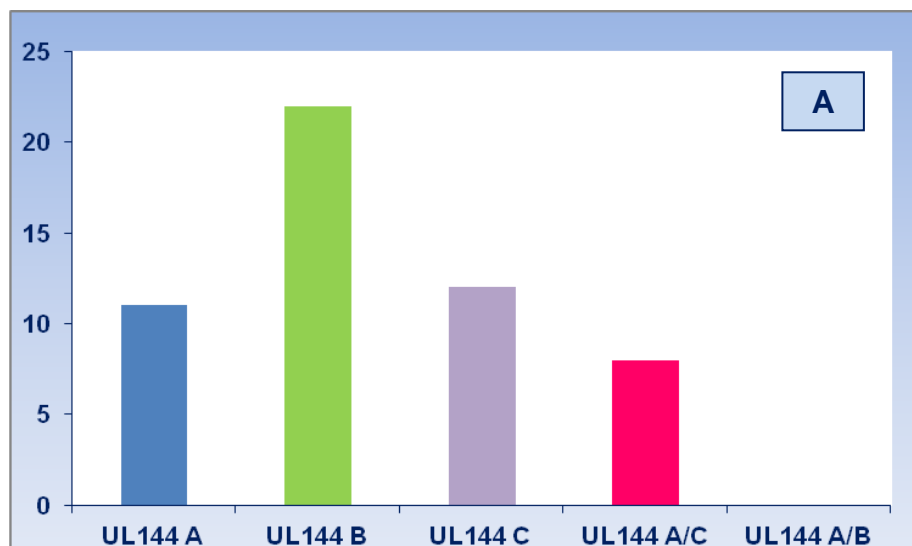


Figura 38. Distribución de los genotipos de UL144 en muestras de infección congénita. A: Global. B: Niños. C: Embarazadas

Cuando se estudiaba el patrón estacional de los genotipos en períodos de 3 años, se observó que todos los genotipos circularon a lo largo de los años, a excepción de UL144 A entre los años 2005-2007 y UL144 A/C entre los años 2008-2010 (**Figura 39**). Los períodos de tiempo comprendidos entre 2005-2007 y 2011-2013 concentraron el mayor número de detecciones.

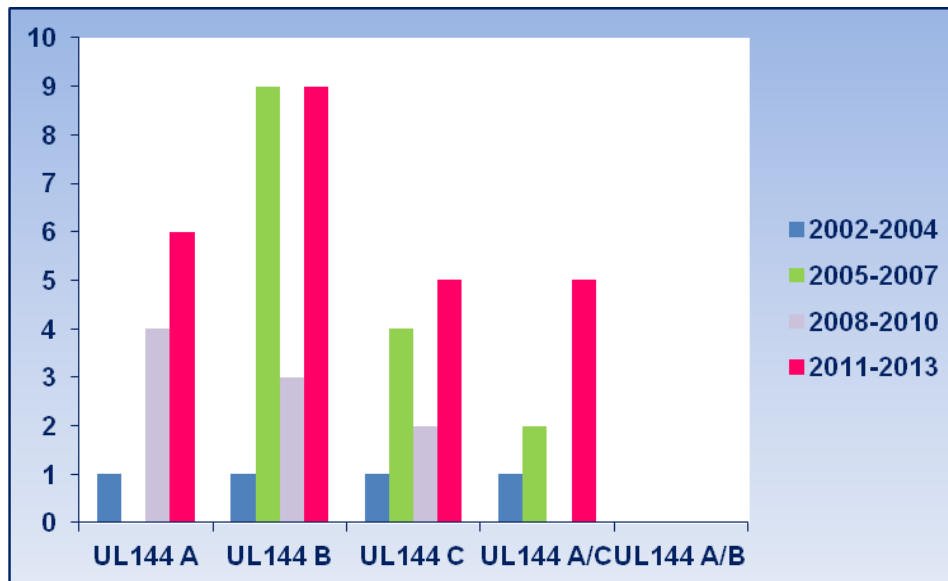


Figura 39. Distribución de los genotipos UL144 en función del año de diagnóstico de infección congénita

Relación entre los genotipos de UL144 y las diferentes variables estudiadas

Las medias y/o medianas de los diferentes parámetros analíticos atendiendo al diferente genotipo de UL144, vienen descritas en la **Tabla 26** y representadas en los gráficos de la **Figura 40**. No hubo diferencia entre las medias y/o medianas de leucocitos ($p = 0.63$), hematíes ($p = 0.49$), plaquetas ($p = 0.82$), GPT ($p = 0.57$), GOT ($p = 0.44$), bilirrubina directa ($p = 0.48$), bilirrubina total ($p = 0.54$) y albúmina ($p = 0.51$), pero si en hemoglobina ($p = 0.05$) y GGT ($p = 0.05$) entre los diferentes genotipos de UL144.

Tabla 26. Parámetros analíticos y su relación con el genotipo de UL144 en los niños con infección congénita									
Parámetro (unidades)	UL144 A			UL144 B			UL144 C		
	Media (± DE)	Mediana (RI)	Media (± DE)	Mediana (RI)	Media (± DE)	Mediana (RI)	Media (± DE)	Mediana (RI)	Mediana (RI)
Leucocitos (x 1000/ μ l)	16030 (± 5614,42)	16030 (12060 - 20000)	12275,45 (± 6681,45)	11000 (8100 - 13930)	9842 (± 2806,97)	10100 (9510 - 11260)	11700 (± 4784,34)	13000 (6400 - 15700)	
Hemáties (x 10 ⁶ / μ l)	4,78 (± 1,13)	4,78 (3,98 - 5,58)	3,88 (± 0,76)	3,79 (3,42 - 4,40)	4,22 (± 0,78)	4,25 (4,11 - 4,66)	434 (± 0,95)	3,90 (3,70 - 5,44)	
Hemoglobina (g/dl)	17,02 (± 2,54)	17,02 (15,4 - 19)	13,04 (± 2,96)	11,8 (10,6 - 15,1)	16,74 (± 2,17)	17,1 (16,7 - 18,4)	16,23 (± 3,01)	14,8 (14,2 - 19,7)	
Plaquetas (x 1000/ μ l)	201,5 (± 50,20)	201,50 (166 - 237)	248,27 (± 143,17)	229 (127 - 315)	285,20 (± 236,01)	182 (172 - 232)	179,0 (± 159,25)	130 (50 - 357)	
Enzimas hepáticas									
GPT (U/l)	27 (± 2,82)	27 (25 - 29)	29,7 (± 24,88)	22,5 (13 - 33)	17,8 (± 7,25)	18 (13 - 19)	22,3 (± 8,38)	18 (17 - 32)	
GOT (U/l)	64,05 (± 19,09)	64,5 (51 - 78)	73,3 (± 87,65)	49 (34 - 55)	46,6 (± 13,70)	44 (41 - 58)	66,33 (± 19,21)	63 (49 - 87)	
GGT (U/l)	390 (± 329,51)	390 (157 - 623)	107 (± 83,14)	93 (49 - 178)	229 (± 155,63)	205 (162 - 212)	126,66 (± 102,78)	184 (8 - 188)	
Bilirrubina total (mg/dl)	9,28 (± 8,22)	9,28 (3,47 - 15,1)	3,81 (± 4,64)	1,61 (0,36 - 6)	4,37 (± 3,75)	3,60 (2,84 - 3,90)	4,50 (± 4,50)	4,30 (0,10 - 9,10)	
Bilirrubina directa (mg/dl)	0,62 (-)	0,62 (-)	1,25 (± 0,76)	1,33 (1 - 1,42)	0,73 (± 0,21)	0,63 (0,59 - 0,98)	-	-	
Albumina (g/dl)	3,57 (-)	3,57 (-)	4,41 (± 1,31)	4,06 (3,8 - 4,13)	3,28 (± 0,62)	3,40 (2,60 - 3,84)	3,95 (± 0,53)	4 (3,40 - 4,47)	

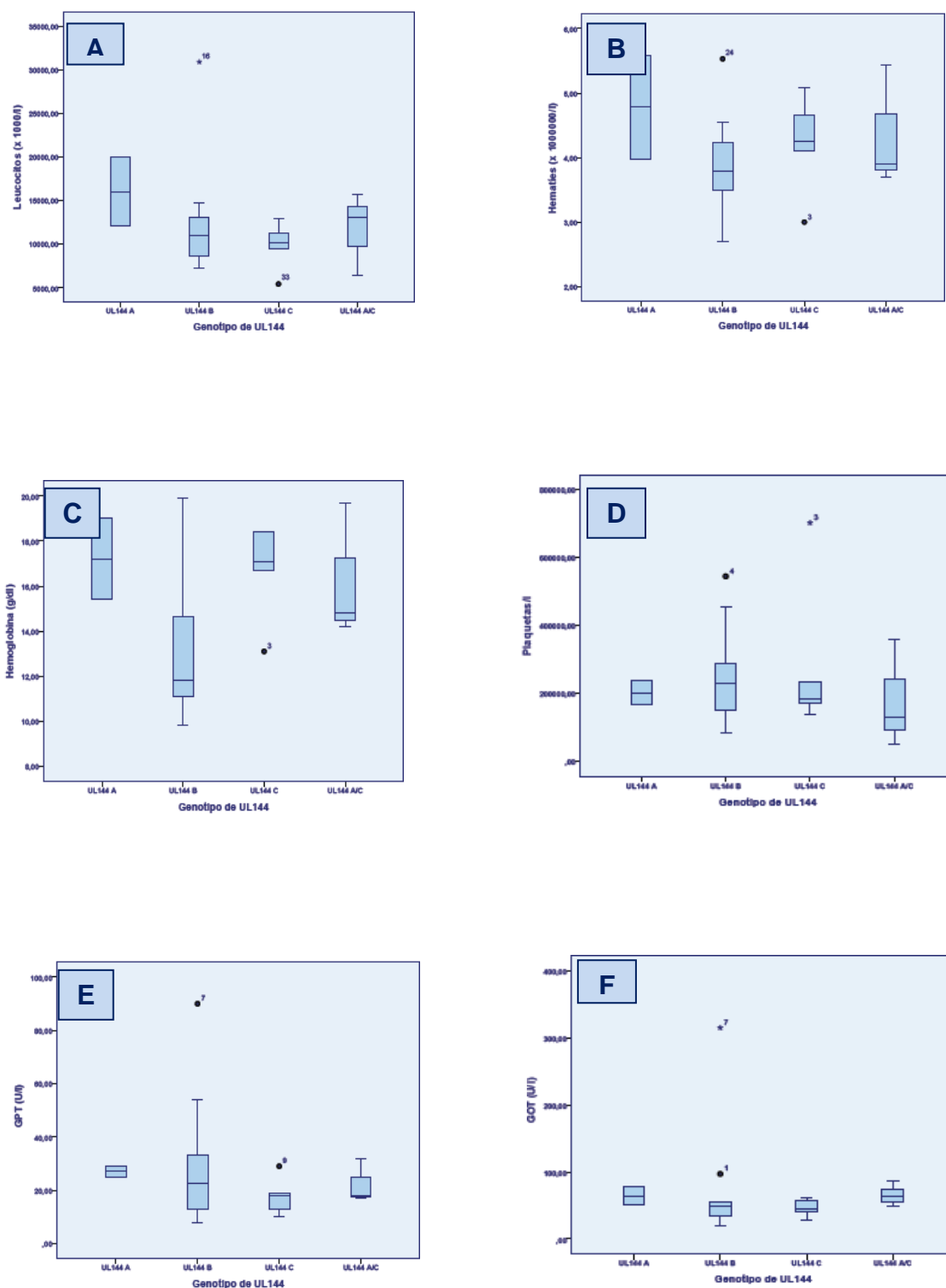


Figura 40. Parámetros analíticos atendiendo a los diferentes genotipos de UL144 en los niños con infección congénita. A: Leucocitos, B: Hematíes, C: Hemoglobina, D: Plaquetas, E: GPT, F: GOT, G: GGT, H: Bilirrubina total, I: Bilirrubina directa, J: Albúmina

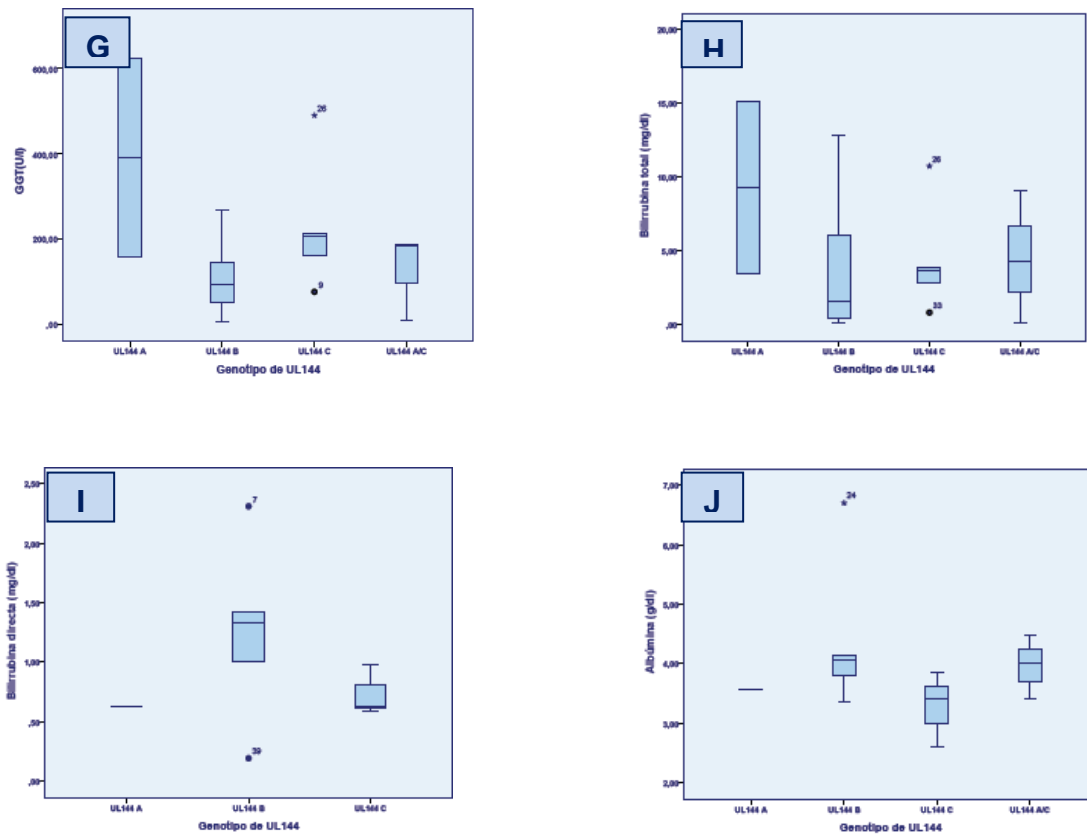


Figura 40 (continuación). Parámetros analíticos atendiendo a los diferentes genotipos de UL144 en los niños con infección congénita. A: Leucocitos, B: Hematíes, C: Hemoglobina, D: Plaquetas, E: GPT, F: GOT, g: GGT, H: Bilirrubina total, I: Bilirrubina directa, J: Albúmina

Las características clínicas estudiadas en los niños con infección congénita y su relación con los diferentes genotipos de UL144 son mostradas en la **Tabla 27**. Los pacientes con genotipo UL144 A presentaban síntomas en el 60%, el 40% afectación neurosensorial, el 60% pruebas de imagen alteradas fundamentalmente alteración de la sustancia blanca, el 40% recibieron tratamiento, y ninguno presentó afectación motora. Los pacientes con genotipo UL144 B manifestaron síntomas en el 85.7%, el 64.3% afectación neurosensorial, el 57.1% afectación comunicativa, el 35.7% afectación motora, el 57.1% pruebas de imagen alteradas, y el 46.6% recibieron tratamiento. Los pacientes con genotipo UL144 C presentaban síntomas en el 71.4%, el 42.8%

retraso de crecimiento uterino, el 50% afectación neurosensorial, el 71.4% pruebas de imagen alteradas fundamentalmente alteración de la sustancia blanca, y el 42.8% recibieron tratamiento. Los pacientes con genotipo UL144 A/C eran sintomáticos en su totalidad, presentaban afectación neurosensorial fundamentalmente auditiva (80%), el 60% afectación comunicativa y motora en el 60%, pruebas de imagen alteradas en el 80%, y el 40% recibieron tratamiento. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las variables estudiadas y los diferentes genotipos, salvo con el genotipo UL144 A/C, donde era más frecuente presentar hipoacusia unilateral con respecto al resto de genotipos ($p = 0.03$).

En los 7 pacientes diagnosticados mediante las tarjetas de pruebas metabólicas se detectaron UL144 A ($n = 1$), UL144 B ($n = 3$) y UL144 A/C ($n = 1$). En dos de éstas, no se logró detectar el genotipo UL144, y 2 de las cargas virales no estuvieron disponibles, correspondiendo a 2 pacientes asignados al genotipo UL144 B y al UL144 A/C, respectivamente. Las medias (\pm DE) y/o medianas (RI) de las cargas virales del genotipo UL144 B fueron 8619 ó $3.93\log_{10}$ (\pm 7298,75 ó $3.86\log_{10}$) copias/ml y 8619 ó $3.93\log_{10}$ [6038,5 ó $3.78\log_{10}$ - 11199,5 ó $4.04\log_{10}$] copias/ml. Al no tener más que un solo valor de carga viral para el genotipo UL144 A y ninguno para A/C, no pudimos llevar a cabo la comparación.

Tabla 27. Relación entre el genotipo de UL144 y las características clínicas en niños con infección congénita													
Características	UL144 A (n = 5)				UL144 B (n = 14)				UL144 C (n = 7)				P
	Número (%)	OR (IC 95%)	P		Número (%)	OR (IC 95%)	P		Número (%)	OR (IC 95%)	P		
Edad al diagnóstico													
Mediana (RI) días													
	5 (3 - 30)		0.69		18 (3 - 90)		0.34		4.5 (3.5 - 14.5)		0.64		
Sexo													
Femenino	3 (60)	0.50 (0.06 - 3.61)	0.34	10 (71.4)	2.00 (0.51 - 7.79)	0.31	3 (42.8)	0.37 (0.04 - 2.38)	0.20	5 (100)	2.14 (0.29 - 25.89)	0.33	
Sintomático	3 (60)	0.22 (0.01 - 3.62)	0.18	12 (85.7)	1.36 (0.13 - 19.09)	0.56	5 (71.4)	1.00 (0.07 - 58.97)	0.70	5 (100)	-	0.37	
Asintomático	2 (40)	4.54 (0.27 - 63.04)	0.18	2 (14.3)	0.73 (0.05 - 7.57)	0.56	2 (28.5)	1.00 (0.01 - 13.74)	0.70	0 (0)	-	0.37	
Hepatoesplenomegalia	1 (20)	5.47 (0.06 - 489.88)	0.31	0 (0)	-	0.31	0 (0)	-	0.58	1 (20)	5.47 (0.06 - 489.88)	0.31	
Rash petequeal	1 (20)	2.74 (0.03 - 65.87)	0.43	0 (0)	-	0.16	1 (14.3)	1.71 (0.02 - 38.62)	0.56	1 (20)	2.74 (0.03 - 65.87)	0.43	
Retraso crecimiento uterino	1 (20)	0.60 (0.01 - 7.48)	0.56	4 (28.5)	1.03 (0.16 - 6.33)	0.63	3 (42.8)	2.30 (0.26 - 18.54)	0.29	1 (20)	0.46 (0.008 - 5.19)	0.44	
Afectación neurossensorial	2 (40)	0.56 (0.02 - 39.26)	0.56	9 (64.3)	0.82 (0.08 - 7.75)	0.59	4 (50)	0.51 (0.04 - 7.61)	0.42	5 (100)	-	0.23	
Auditiva	2 (40)	1.36 (0.06 - 90.63)	0.65	6 (42.8)	0.45 (0.06 - 2.96)	0.28	3 (42.8)	0.59 (0.06 - 5.73)	0.45	4 (80)	-	0.10	
Hipoacusia bilateral	1 (20)	0.87 (0.01 - 19.51)	0.71	5 (35.7)	1.57 (0.23 - 11.41)	0.44	2 (28.5)	0.86 (0.06 - 8.03)	0.63	1 (20)	0.55 (0.009 - 8.38)	0.54	
Hipoacusia unilateral	1 (20)	1.66 (0.02 - 38.70)	0.57	1 (7.1)	0.15 (0.002 - 1.80)	0.09	1 (14.3)	0.57 (0.009 - 7.36)	0.54	3 (60)	15.03 (0.90 - 994.71)	0.03	
Ocular	0 (0)	-	0.43	4 (28.5)	2.87 (0.32 - 39.00)	0.24	1 (14.3)	0.61 (0.01 - 7.83)	0.57	1 (20)	0.80 (0.01 - 11.21)	0.67	
Afectación comunicativa	1 (20)	0.29 (0.005 - 4.28)	0.29	8 (57.1)	2.40 (0.52 - 10.99)	0.25	2 (28.5)	0.42 (0.03 - 3.75)	0.32	3 (60)	1.60 (0.15 - 22.70)	0.50	
Afectación motora	0 (0)	-	0.18	5 (35.7)	1.68 (0.26 - 11.5)	0.39	1 (14.3)	0.36 (0.006 - 4.15)	0.34	3 (60)	4.00 (0.36 - 59.21)	0.17	
Afectación neurológica	1 (20)	0.71 (0.01 - 10.67)	0.63	4 (28.5)	0.97 (0.14 - 6.19)	0.64	2 (28.5)	0.86 (0.06 - 7.11)	0.63	2 (40)	1.59 (0.11 - 17.38)	0.50	
Microcefalia	1 (20)	0.90 (0.01 - 12.47)	0.71	3 (21.4)	1.71 (0.18 - 16.12)	0.43	1 (14.3)	0.54 (0.009 - 6.59)	0.52	1 (20)	0.90 (0.01 - 12.47)	0.71	
Pruebas de imagen alteradas	3 (60)	1.22 (0.08 - 73.99)	0.68	8 (57.1)	0.41 (0.04 - 2.84)	0.25	5 (71.4)	2.27 (0.19 - 125.88)	0.43	4 (80)	1.71 (0.13 - 98.31)	0.55	
Alteración de la sustancia blanca	2 (40)	1.94 (0.12 - 31.64)	0.45	3 (21.4)	0.35 (0.04 - 2.22)	0.18	3 (42.8)	2.08 (0.22 - 19.91)	0.35	2 (40)	1.23 (0.08 - 13.36)	0.60	
Calcificaciones cerebrales	0 (0)	-	0.85	0 (0)	-	0.51	1 (14.3)	-	0.18	0 (0)	-	0.81	
Calcificaciones periventriculares	0 (0)	-	0.41	3 (21.4)	1.76 (0.16 - 25.07)	0.46	1 (14.3)	1.12 (0.01 - 16.68)	0.67	1 (20)	1.12 (0.01 - 16.68)	0.67	
Calcificaciones de las arterias estriadas	0 (0)	-	0.61	1 (7.1)	0.54 (0.008 - 11.93)	0.55	1 (14.3)	1.94 (0.02 - 45.01)	0.52	1 (20)	2.51 (0.03 - 60.47)	0.45	
Leucoencefalopatía	0 (0)	-	0.46	2 (14.3)	1.34 (0.08 - 21.35)	0.59	1 (14.3)	1.10 (0.01 - 17.13)	0.67	1 (20)	1.79 (0.02 - 30.46)	0.53	
Quistes periventriculares/matriz germinal	1 (20)	1.25 (0.02 - 20.23)	0.64	3 (21.4)	1.19 (0.12 - 11.01)	0.60	0 (0)	-	0.19	2 (40)	3.01 (0.19 - 37.38)	0.28	
Ventriculomegalia	0 (0)	-	0.51	2 (14.3)	1.17 (0.07 - 18.75)	0.64	1 (14.3)	1.25 (0.02 - 20.23)	0.64	1 (20)	1.63 (0.02 - 27.88)	0.56	
Tratamiento	2 (40)	1.31 (0.05 - 88.36)	0.66	7 (46.6)	1.23 (0.17 - 9.29)	0.56	3 (42.8)	0.95 (0.08 - 14.21)	0.67	2 (40)	0.59 (0.03 - 9.98)	0.51	

Nota: A dos de los pacientes no se le pudo asignar el genotipo de UL144. Seis de los pacientes (2 A, 1 B, 1 C, 2 AC) no se encuentran incluidos en esta tabla porque no se dispuso de ningún dato clínico

Las diferentes características clínicas estudiadas en las gestantes con diagnóstico prenatal de infección congénita atendiendo al genotipo de UL144, son mostradas en la **Tabla 28**. Las mujeres con genotipo UL144 A solamente eran primigestas en el 25%, todos los fetos infectados presentaron hallazgos ecográficos extracerebrales y cerebrales, y la mitad de las pacientes decidieron interrumpir el embarazo. La totalidad de las mujeres con genotipo UL144 B habían tenido un embarazo anterior, más de la mitad (60%) de los fetos infectados presentaron hallazgos ecográficos extracerebrales y el 80% cerebrales, y el 80% de las gestantes decidió interrumpir la gestación. Las gestantes con genotipo UL144 C eran primigestas, el 33% de los fetos infectados presentó hallazgos ecográficos extracerebrales y el 66.6% cerebrales como ventriculomegalia, y el 66.6% decidió poner fin al embarazo.. La única paciente asignada al genotipo A/C había tenido un embarazo previo, el feto infectado presentó hallazgos extracerebrales y cerebrales, y decidió continuar con el embarazo instaurándosele tratamiento. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la relación de las características clínicas estudiadas y los diferentes genotipos de UL144, salvo con los genotipos UL144 B y UL144 C. El genotipo UL144 C fue más frecuente en mujeres embarazadas de menor edad [24 (21-25,5), $p=0.005$], y se presentaba con mayor frecuencia en las mujeres embarazadas primigestas, mientras que el genotipo UL144 B fue más frecuente en mujeres de mayor edad [34 (31-36), $p=0.04$], y se presentaba con mayor frecuencia la esplenomegalia como hallazgo extracerebral.

Tabla 28. Relación entre el genotipo de UL144 y las características clínicas en el diagnóstico prenatal de infección congénita										
Características	UL144 A (n = 4)			UL144 B (n = 5)			UL144 C (n = 3)			UL144 AC (n = 1)
	Número (%)	OR (IC 95%)	P	Número (%)	OR (IC 95%)	P	Número (%)	OR (IC 95%)	P	P
Edad (media, DE) años	32,25 (± 5,56)		0.47	33,57 (± 2,82)		0.04	23,25 (± 3,77)		0.005	0.82
Edad (mediana, RI) años	32 (28 - 36)			34 (31 - 36)			24 (21 - 25,5)			
Antecedentes obstétricos										
Primigesta	1 (25)	0,68 (0,009 - 14,33)	0,64	0 (0)	-	0,09	3 (100)	-	0,01	0,69
> 2 embarazos	3 (75)	1,45 (0,06 - 104,63)	0,64	5 (100)	-	0,09	0 (0)	-	0,01	0,69
Hallazgos extracerebrales										
Afectación Cardíaca	4 (100)	-	0,25	3 (60)	0,28 (0,003 - 7,54)	0,36	1 (33,3)	0,28 (0,002 - 29,36)	0,45	0,75
Cardiomegalia	3 (75)	1,71 (0,08 - 125,54)	0,59	3 (60)	0,62 (0,02 - 13,19)	0,57	1 (33,3)	0,46 (0,004 - 44,75)	0,57	0,66
Derivante pericárdico	2 (50)	0,62 (0,02 - 13,19)	0,57	3 (60)	1,11 (0,06 - 22,00)	0,68	1 (33,3)	0,69 (0,007 - 65,28)	0,68	0,58
Afectación hepática	1 (25)	2,16 (0,02 - 208,87)	0,57	1 (20)	1,44 (0,01 - 137,09)	0,68	0 (0)	-	0,88	0,83
Esplenomegalia	3 (75)	1,71 (0,08 - 125,54)	0,59	3 (60)	0,62 (0,02 - 13,19)	0,57	1 (33,3)	0,46 (0,004 - 44,75)	0,57	0,66
Ascitis	0 (0)	-	0,25	3 (60)	-	0,04	0 (0)	-	0,54	0,75
Afectación Intestinal	2 (50)	5,73 (0,20 - 470,32)	0,23	1 (20)	0,64 (0,008 - 17,22)	0,63	0 (0)	-	0,54	0,75
Afectación pulmonar	2 (50)	-	0,09	0 (0)	-	0,31	0 (0)	-	0,68	0,83
Afectación renal	1 (25)	2,16 (0,02 - 208,87)	0,57	1 (20)	1,44 (0,01 - 137,09)	0,68	0 (0)	-	0,68	0,83
	0 (0)	-	0,66	1 (20)	-	0,41	0 (0)	-	0,83	0,91
Hallazgos cerebrales										
Hiperecogenicidad periventricular	4 (100)	-	0,66	4 (80)	-	0,41	2 (66,6)	-	0,83	0,91
Placentomegalia	2 (50)	2,97 (0,10 - 235,24)	0,42	2 (40)	0,69 (0,03 - 12,14)	0,60	0 (0)	-	0,27	0,45
Quistes	2 (50)	5,73 (0,20 - 470,32)	0,23	1 (20)	0,64 (0,008 - 17,22)	0,63	0 (0)	-	0,54	0,75
Ventriculomegalia	0 (0)	-	0,50	1 (20)	1,22 (0,01 - 117,49)	0,72	0 (0)	-	0,85	0,18
	2 (50)	4,95 (0,17 - 411,49)	0,27	1 (20)	0,28 (0,003 - 5,89)	0,34	2 (66,6)	1,87 (0,01 - 182,74)	0,61	0,63
Tratamiento recibido										
Interrupción voluntaria del embarazo	2 (50)	2,71 (0,12 - 67,29)	0,40	1 (20)	0,36 (0,005 - 7,20)	0,42	0 (0)	-	0,42	0,33
	2 (50)	0,36 (0,0149 - 8,31)	0,40	4 (80)	2,74 (0,13 - 196,19)	0,42	2 (66,6)	-	0,42	0,33

Nota: A una de las pacientes no se le pudo asignar el genotipo de UL144. Además, tres pacientes (2 UL144 B y 1 UL144 C) no se encuentran incluidos en la tabla porque no dispuso de ningún dato clínico.

En los líquidos amnióticos incluidos, se detectaron 4 de 5 genotipos: 1 UL144 A, 2 UL144 B, 3 UL144 C y 1 UL144 A/C. Una de las cargas virales no estuvo disponible (1 UL144 A). La media (\pm DE) y/o mediana (RI) de la carga viral para el genotipo UL144 B fue: 19770507 ó $7.29\log_{10}$ ($\pm 10557671,34$ ó $7.02\log_{10}$) copias/ml y 19770507 ó $7.29\log_{10}$ [16037806,5 ó $7.20\log_{10}$ - 23503207,5 ó $7.37\log_{10}$] copias/ml. La media (\pm DE) y/o mediana (RI) de la carga viral para el genotipo UL144 C fue: 26775050 ó $7.42\log_{10}$ ($\pm 6047149,60$ ó $6.78\log_{10}$) copias/ml y 26198086 ó $7.41\log_{10}$ [23617573,5 ó $7.37\log_{10}$ - 29644044,5 ó $7.47\log_{10}$] copias/ml. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias y/o medianas de las cargas virales de los líquidos amnióticos pertenecientes a los genotipos UL144 B y UL144 C ($p = 0.30$).

En las sangres fetales incluidas, se detectaron 3 de los 5 genotipos: 3 UL144 A, 6 UL144 B, 1 UL144 C, y a una de las muestras no se le pudo asignar el genotipo por amplificación negativa repetida. Las medias (\pm DE) y/o medianas (RI) de los diferentes parámetros analíticos de las sangres fetales del genotipo UL144 A y UL144 B fueron: leucocitos [14,90 ($\pm 17,42$) y 5,70 (4 ; 35) $\times 10^3/\mu\text{l}$ vs 8,16 ($\pm 17,42$) y 4,62 (4,30 - 12,02) $\times 10^3/\mu\text{l}$, $p = 0.51$], hematíes [2,39 ($\pm 0,89$) y 2,89 (1,36 - 2,92) $\times 10^6/\mu\text{l}$ vs 2,65 ($\pm 0,80$) y 2,91 (2,08 - 3,21) $\times 10^6/\mu\text{l}$, $p = 0.70$], hemoglobina [10,33 ($\pm 3,66$) y 12,3 (6,10 - 12,6) g/dl vs 10,12 ($\pm 2,17$) y 10,3 (8,7 - 11,5) g/dl, $p = 0.92$], y plaquetas [17,33 ($\pm 55,07$) y 20 (11 - 21) $\times 10^3/\mu\text{l}$ vs 61,25 ($\pm 55,22$) y 50 (17 - 105) $\times 10^3/\mu\text{l}$, $p = 0.37$]. Dos de las cargas virales del genotipo UL144 B no estuvieron disponibles. La media (\pm DE) y/o mediana (RI) de la carga viral para el genotipo UL144 A fue 36185,66 ó

4.55log₁₀ (\pm 43143,13 ó 4.63log₁₀) y 11757 ó 4.07log₁₀ [10800 ó 4.03log₁₀ - 86000 ó 4.93log₁₀] copias/ml, respectivamente. La media (\pm DE) y/o mediana (RI) de la carga viral del genotipo UL144 B fue 1117680 ó 6.04log₁₀ (\pm 1604521,83 ó 6.20log₁₀) y 509825 ó 5.70log₁₀ [62457 ó 4.79log₁₀ - 2172902 ó 6.33log₁₀] copias/ml, respectivamente. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las medias y/o medianas de las cargas virales de las sangres fetales pertenecientes a los genotipos UL144 A y UL144 B ($p = 0.39$).

4.3.3.2 UL144 en infección adquirida

La distribución de los genotipos de UL144 de las muestras de infección adquirida se encuentra representada en la **Figura 41**. Todos los genotipos de glicoproteína UL144 (UL144 A, UL144 B, UL144 C, UL144 A/C, UL144 A/B) fueron detectados, y a una (2.5%) de las muestras no se le pudo asignar el genotipo por una amplificación negativa repetida. Los genotipos de glicoproteína más prevalentes fueron UL144 B (30%) y UL144 A/C (30%) seguido de UL144 A (22.4%), UL144 C (12.5%), y UL144 A/B (2.5%).

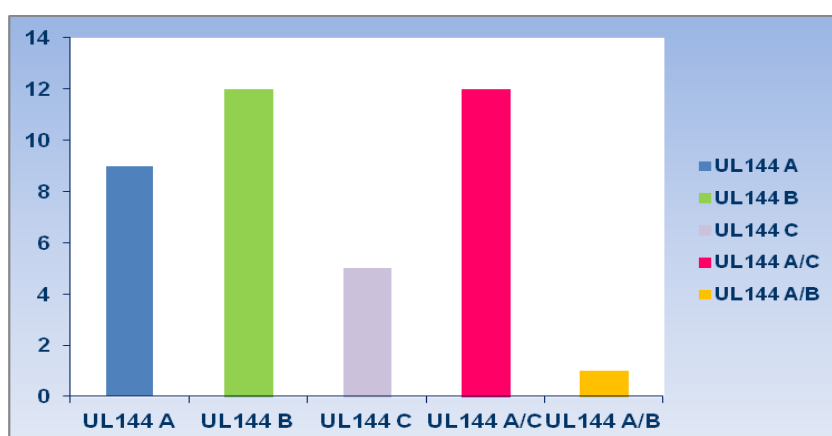


Figura 41. Distribución de los genotipos UL144 en las muestras de pacientes con infección adquirida

Cuando se estudiaba el patrón estacional de los genotipos en períodos de 3 años, se observó que la mayoría de los genotipos circulaban a lo largo de todo el período estudiado. UL144C no estuvo presente entre los años 2011 - 2013, UL144 A/C entre los años 2002-2004, y UL144 A/B solamente estuvo presente en el primer periodo estudiado (**Figura 42**).

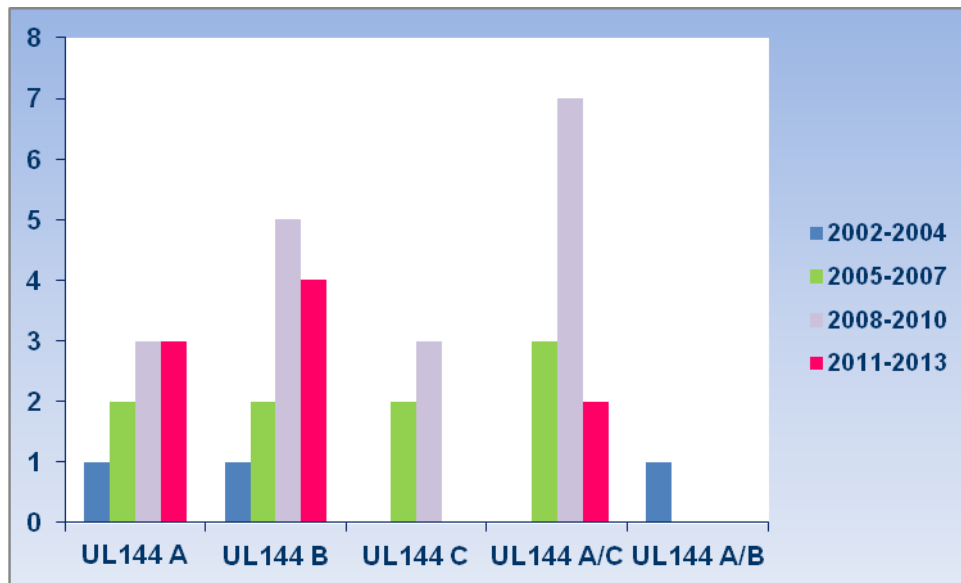


Figura 42. Distribución de los genotipos de UL144 en función del periodo estudiado en pacientes con infección adquirida

Ningún genotipo predominó cuando se comparaban las poblaciones de infección congénita e infección adquirida ($p_{UL144A} = 0.78$, $p_{UL144B} = 0.29$, $p_{UL144C} = 0.23$, $p_{UL144A/C} = 0.07$, $p_{UL144A/B} = 0.24$), sin embargo, el genotipo UL144 A/B estuvo presente en infección adquirida y no en infección congénita (**Figura 43**, **Figura 44**).

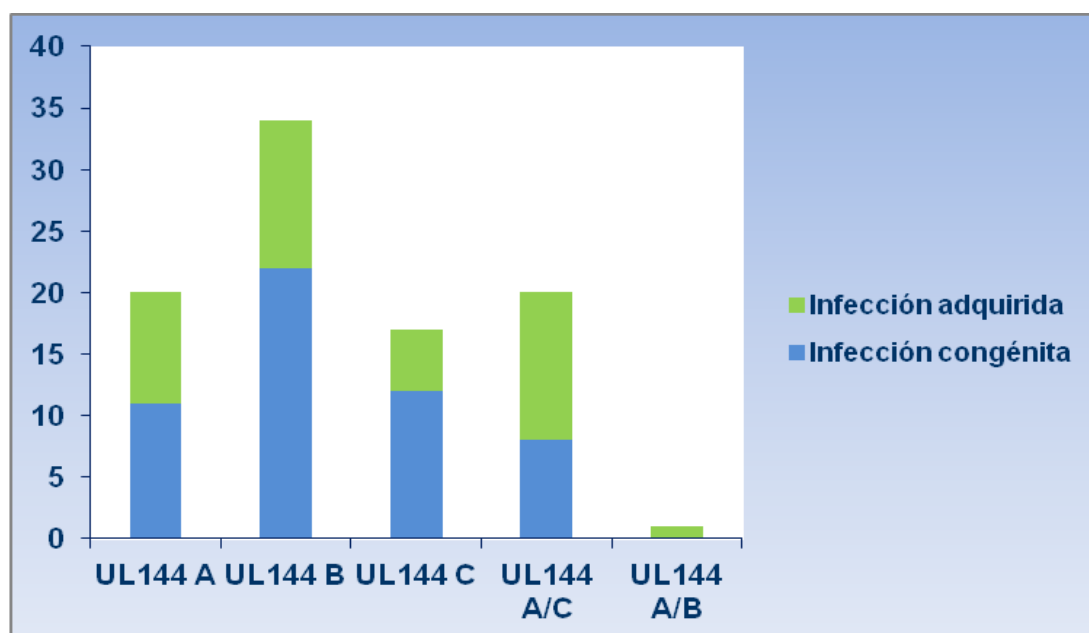


Figura 43. Distribución de los genotipos de UL144 en niños con infección congénita y adquirida

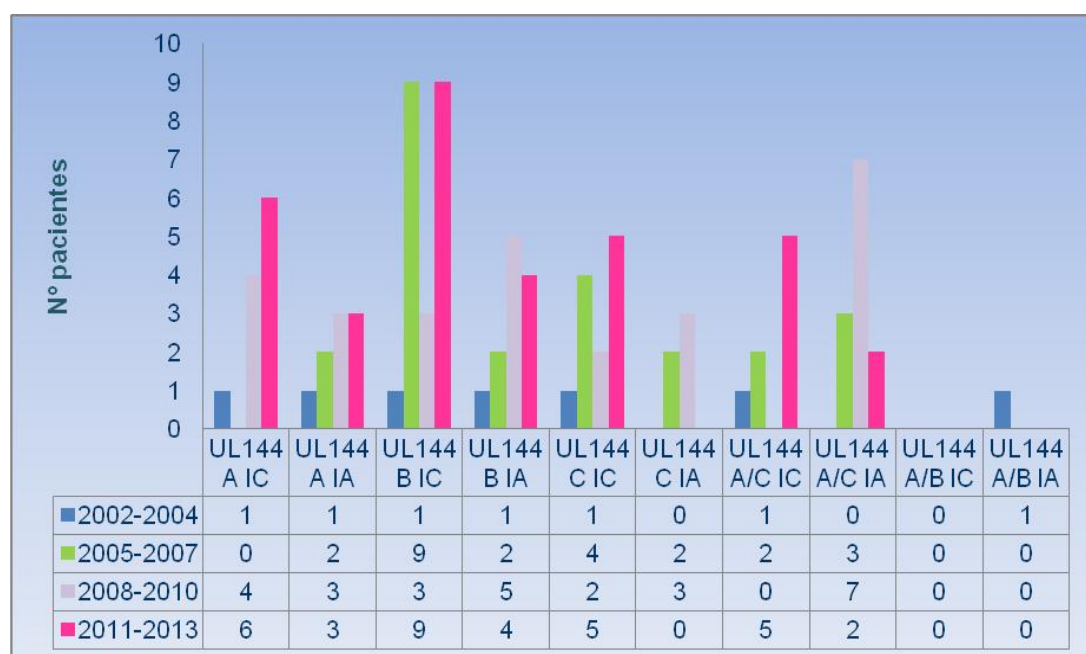


Figura 44. Distribución de los genotipos UL144 en función del año de diagnóstico de infección congénita y adquirida

4.3.3.3 UL144 en pacientes trasplantados

Cuatro de los genotipos de UL144 (UL144A, UL144B, UL144C, y UL144A/C) fueron detectados. No se pudo asignar el genotipo en 15 (9.25%) muestras de 14 pacientes debido a un resultado repetido de amplificación negativa. La distribución de los genotipos de UL144 de las muestras de infección por CMVh en trasplante fue UL144 A (3.7%), UL144 B (79.6%), UL144 C (4.3%), y UL144 A/C (3.08%).

No en todos los casos estudiados en los que los pacientes aportaban más de una muestra (51.6%), se detectaron los mismos genotipos. En 14 (43.7%) pacientes de los 32, el genotipo detectado era el mismo (UL144 B): 4 pacientes con 2 muestras, 3 pacientes con 3 muestras, 2 pacientes con 4 muestras, 3 pacientes con 6 muestras, y 2 pacientes con 7 muestras. El resto de pacientes (56.25%) mostraron los genotipos de UL144 representados en la

Tabla 29.

Tabla 29. Pacientes trasplantados con más de una muestra en las que se encontraron diferentes genotipos de UL144			
Paciente	2 muestras	Paciente	3 muestras
183	1 UL144 B, 1 no detectado	80	1 UL144 B, 1 UL144 A/C, 1 no detectado
216	1 UL144 B, 1 no detectado	85	2 UL144 B, 1 no detectado
		168	2 UL144 B, 1 UL144 C
Paciente	4 muestras	Paciente	5 muestras
96	3 UL144 B, 1 UL144 A	166	3 UL144 B, 1 UL144 A, 1 no detectado
147	3 UL144 B, 1 UL144 C	200	4 UL144 B, 1 no detectado
150	3 UL144 B, 1 no detectado	206	4 UL144 B, 1 no detectado
233	3 UL144 B, 1 UL144 C		
234	2 UL144 B, 2 UL144 A		
236	2 UL144 B, 2 UL144 C		
252	3 UL144 B, 1 no detectado		
Paciente	6 muestras	Paciente	7 muestras
225	5 UL144 B, 1 no detectado	93	4 UL144 B, 2 UL144 A/C, 1 no detectado
235	3 UL144 B, 1 UL144 C, 2 no detectado		

Las diferentes variables estudiadas en los pacientes trasplantados atendiendo al genotipo de UL144 vienen descritas en la **Tabla 30**. No se encontró relación alguna con las diferentes características clínicas, salvo el genotipo UL144 C que se encontró de manera menos frecuente en aquellos pacientes con viremia asintomática ($p=0.04$). Las medias y/o medianas de antigenemia y cargas virales son mostradas en la **Tabla 30** y representadas en los gráficos de la **Figura 45**. Ninguno de los genotipos de UL144 se relacionó con presentar mayor o menor valor de antigenemia y carga viral.

Tabla 30. Relación entre el genotipo de UL144 y las diferentes características clínicas estudiadas en receptores de trasplante													
Características		UL144 A (n = 6)				UL144 B (n = 129)				UL144 C (n = 7)			
		Número (%)	OR (IC 95%)	P		Número (%)	OR (IC 95%)	P		Número (%)	OR (IC 95%)	P	
Edad al diagnóstico													
Media (± DE) años		49,66 (±22,25)		0,63		52,43 (± 14,44)		0,94		51,00 (± 15,20)		0,78	
Mediana (RI) años		59,5 (25 - 68)				56 (40 - 65)				55 (42 - 65)		54 (54 - 63)	
Sexo													
Masculino		3 (50)		3,54 (0,68 - 18,46)		100 (77,5)		0,75 (0,24 - 2,29)		6 (85,7)		0,54 (0,01 - 4,72)	
										4 (80)		0,82 (0,01 - 8,74)	
IgG anti-CMV positiva pretrasplante		5 (83,3)		1,12 (0,11 - 55,49)		106 (82,1)		1,31 (0,28 - 4,71)		6 (85,7)		1,36 (0,15 - 65,33)	
				0,69				0,42		3 (60)		0,32 (0,03 - 4,06)	
Viremia Asintomática		5 (83,3)		4,88 (0,52 - 236,41)		67 (51,9)		1,08 (0,40 - 2,89)		1 (28,5)		0,14 (0,003 - 1,25)	
				0,12				0,87		3 (60)		1,41 (0,15 - 17,41)	
Síndrome viral		1 (16,6)		0,20 (0,004 - 1,89)		62 (48,06)		0,92 (0,34 - 2,48)		6 (85,7)		6,84 (0,79 - 322,59)	
				0,12				0,87		2 (40)		0,70 (0,05 - 6,36)	
Enfermedad		1 (16,6)		1,45 (0,02 - 14,18)		16 (12,4)		1,13 (0,22 - 11,06)		1 (28,5)		1,20 (0,02 - 10,91)	
				0,54				0,61		0 (0)		-	

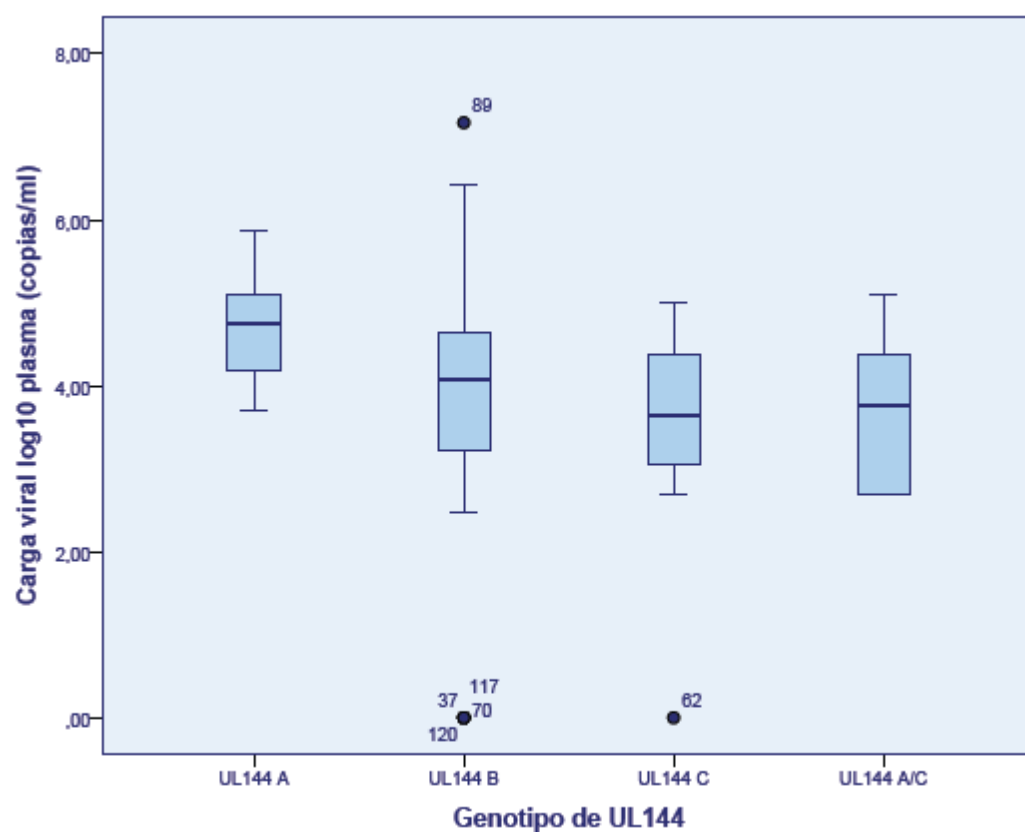
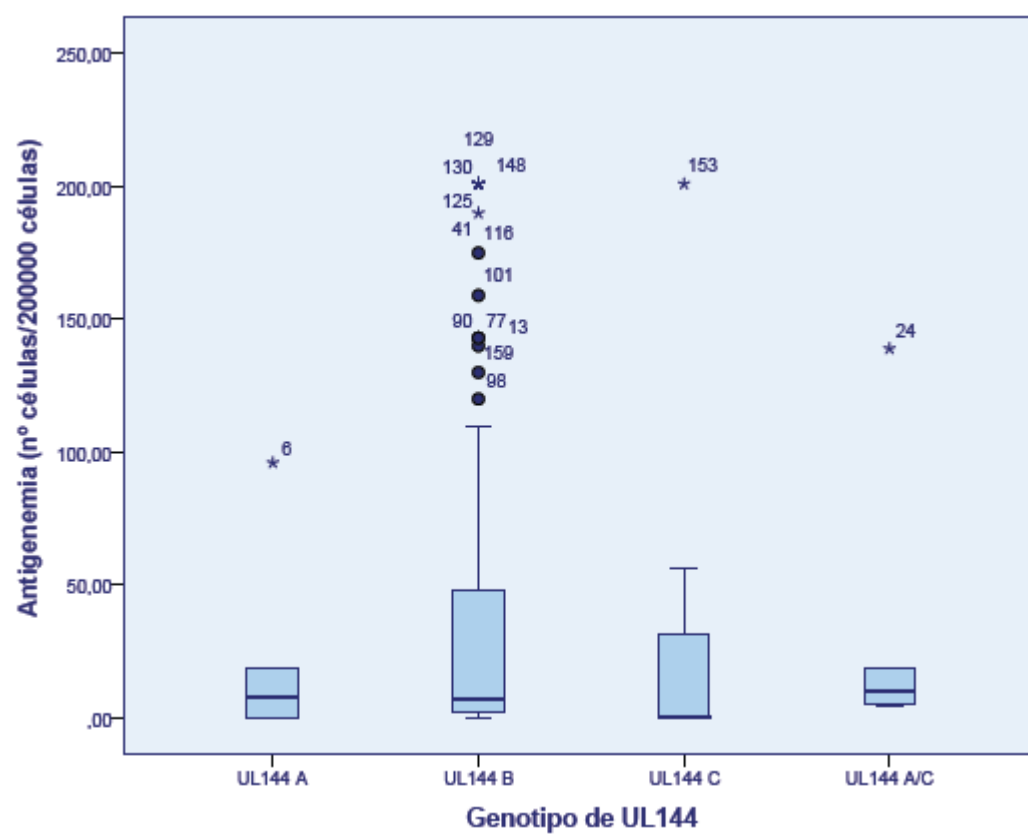


Figura 45. Medianas de la antigenemia, carga viral en plasma y carga viral en células atendiendo al genotipo de UL144

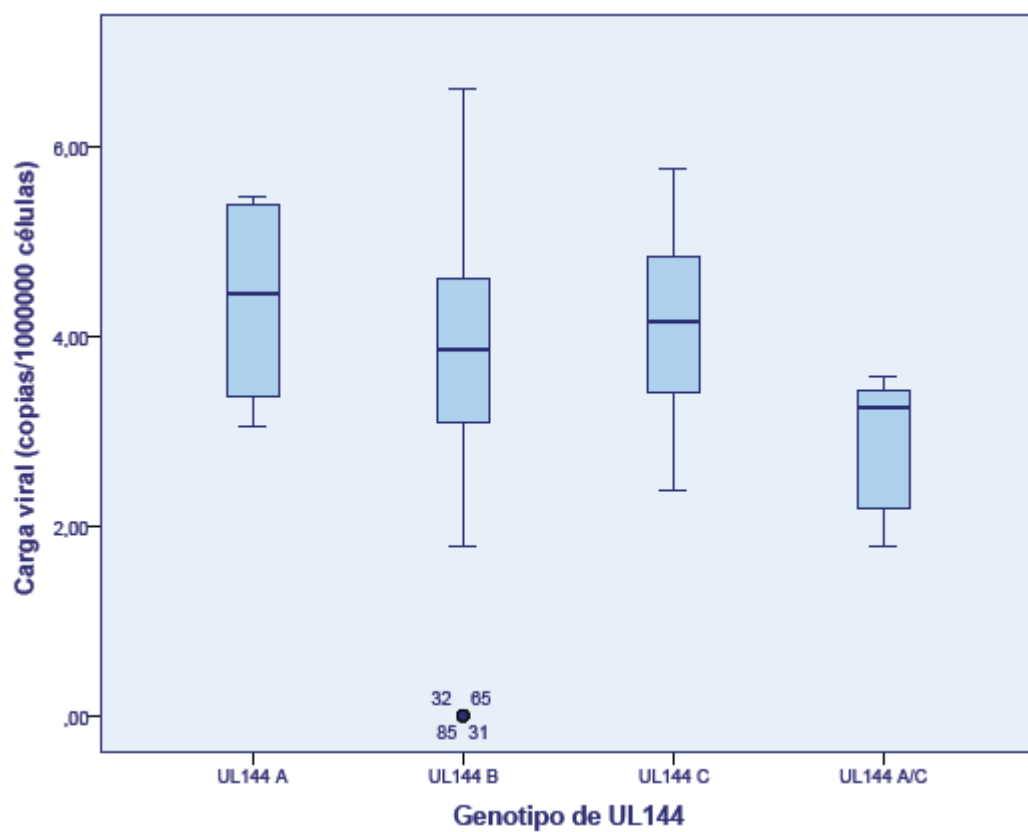


Figura 45 (continuación). Medianas de la antigenemia, carga viral en plasma y carga viral en células atendiendo al genotipo de UL144

V.DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

CMVh es el agente etiológico más frecuente de infección congénita a nivel mundial, pero muchas veces pasa desapercibido, incluso pese a que es más habitual que la mayoría de las enfermedades incluidas en las pruebas de cribado neonatal en Europa ¹²⁶. Diversos grupos a nivel internacional trabajan en la epidemiología molecular de este virus en infección congénita, así como en los marcadores de virulencia, entre los que destacan los grupos de trabajo de la Universidad College de Londres (Suresh B. Boppana, Shannon A. Ross, Karen B. Fowler), Universidad de Bolonia (Tiziana Lazzarotto, Maria P. Landini), Universidad de Alabama en Birmingham (Robert F. Pass) o del Hospital Johns Hopkins de Baltimore (Ravit Arav-Boger). En España, existe un único grupo de trabajo promovido por la Sociedad Española de Infectología Pediátrica y encabezado por el Dr. Baquero, del que el Hospital Universitario 12 de Octubre forma parte. A pesar de este hecho, hasta lo que llega nuestro conocimiento, no existe ningún estudio acerca de los genotipos de CMVh en infección congénita en nuestro país.

A lo largo de los años los protocolos de diagnóstico y de actuación frente a CMVh congénito han cambiado. Todas las peticiones se realizaron de acuerdo al criterio clínico de los diferentes médicos solicitantes. Se trató de un estudio retrospectivo, debido a la dificultad para reunir un número de casos de infección congénita significativo de manera prospectiva, lo que conllevó la pérdida de cierto número de datos clínicos, analíticos, así como alguno microbiológico. Uno de los objetivos principales de nuestro estudio fue evaluar si la detección de determinados marcadores de virulencia en el genoma viral de

CMVh como glicoproteína B, glicoproteína H y la región UL144 se asociaban con la severidad del cuadro clínico estudiado, comparando la distribución de los mismos con los resultados obtenidos con un grupo control de pacientes pediátricos y con las cepas encontradas en pacientes de receptores de órgano sólido que habían producido diferentes manifestaciones clínicas. A continuación, discutiremos en los 4 apartados siguientes los diferentes resultados atendiendo a los objetivos expuestos en esta tesis.

5.1 FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN DE LOS DIFERENTES GENOTIPOS DE GLICOPROTEÍNA B, GLICOPROTEÍNA H Y UL144 EN PACIENTES CON INFECCIÓN CONGÉNITA POR CMVh

Muchos factores, incluyendo las diferencias en las enfermedades de base, raza, tecnología utilizada, pueden explicar la distribución geográfica de los genotipos de CMVh. De hecho, la frecuencia de un genotipo u otro de glicoproteína B y H ha sido relacionada con la distribución geográfica y demográfica ^{37,66,78-82,100,275-281}, aunque no existen reseñas en cuanto a su distribución a lo largo del período estudiado. Dentro de los estudios de infección congénita en relación con estas glicoproteínas, se encuentran pocos en los que se incluya el período de estudio ^{79-82,275,283}, y además ninguno especifica si algún genotipo predominó en un determinado intervalo de tiempo. Sólo 3 de ellos, incluyeron muestras de un amplio periodo de 7 ⁸¹, 8 ⁸² ó 11 ²⁷⁵ años, y el resto de 3 a 5 años ^{79,80,283}. El estudio que nos compete, incluyó muestras de 11 años. En el pudimos observar, que todos los genotipos tanto de gB como de gH circularon a lo largo de todos los años, a excepción de algún genotipo como gB4, lo que podría ser debido a la escasa representación de este genotipo en la población, y por el número limitado de sujetos incluidos en

DISCUSIÓN

el estudio, destacando que durante los años 2005-2007 predominó los genotipos gB3 y gH2, y en los años 2011-2013 los genotipos gB2 y gH1.

El genotipo de glicoproteína B más prevalente en infección congénita fue el genotipo 3, el cual estuvo presente en más de un tercio de la población estudiada (34.5%), que junto con el genotipo 1 aportaban aproximadamente el 60% de los casos estudiados. Este valor de frecuencia era similar al reportado por un estudio holandés, donde el 32% de los 41 recién nacidos con infección congénita diagnosticados mediante tarjeta de pruebas metabólicas era genotipo 3. Aunque, cuando se estudiaba otro tipo de muestra como orina, en otra población de 21 recién nacidos, los genotipos que prevalecían era gB1 (48%) y gB3 (29%) ²⁷⁵ pero no hubo diferencias significativas. A pesar de la situación geográfica, nuestro patrón de frecuencia se asemejaba al de un estudio indio, en donde el genotipo 3 se presentaba con mayor asiduidad (49.2%), seguido del genotipo 1 (24.4%), y 2 (22.4%). Sin embargo, no encontraron el genotipo 4 en los sujetos que estudiaron ⁷⁸, mientras que en el 9.1% de nuestra población estuvo presente. A diferencia de nuestro estudio, en general, el genotipo 1 ha sido identificado como el genotipo más prevalente. Sin embargo, cuando nuestras muestras eran estratificadas por tipo de paciente como niños o embarazadas, la prevalencia era algo diferente. En niños, los genotipos gB1, gB2 y gB3 se presentaban con la misma frecuencia (28.9%), y gB4 en el 10.5%. Diversos estudios realizados en el resto de Europa, como en Holanda (46%) ⁸¹, Sur de Polonia (63.5%) ²⁷⁶, Sur de Hungría (100%) ²⁸³, Centro de Polonia (~50%) ⁸⁰, percibieron que el genotipo 1 era el más prevalente y mostraban tasas cuyo rango iba desde el 33% hasta el 100%. Tres años antes, los autores del estudio polaco de 2015 ⁸⁰, determinaron que el

DISCUSIÓN

genotipo 2 era el más prevalente, englobando el 96% de los pacientes y con una leve muestra del 4% del genotipo 3, no detectando gB1 ni gB4 ¹⁰⁰. Al igual que en otro país como Méjico, donde el 76.5% de la población estudiada presentaba el genotipo gB2 ⁷⁹. En otros estudios realizados en este mismo continente, se observó que entre el 60 y 80% de los niños americanos estudiados, eran gB1 o gB2, siendo gB1 el más prevalente ^{82,284}. Esto ocurría también en países del continente asiático como Japón ³⁷ o China ²⁷⁷, con el genotipo 1 y en vez del 2 el 3, e incluso en Turquía se estimó que el 83.3% de los niños con infección congénita eran sólo gB1 ²⁷⁸. En dichas investigaciones, no se detectó el genotipo 4 ^{37,77}, en un estudio polaco tampoco ⁸⁰, e inclusive en alguno ni el genotipo 2 ³⁷. En nuestro caso, los genotipos 2 (25.4%) y 4 (9.1%) si estuvieron presentes, hasta en determinadas series, el genotipo 4 acontecía con frecuencias del 13% ⁸² y del 28.8% ²⁷⁶, incluso en algunas no aparecía como genotipo único, pero si mixto ⁷⁹. Por lo que nuestro estudio demostró, que cualquiera de los genotipos de glicoproteína B, pueden ser transmitidos de madre a hijo.

Como hemos mencionado anteriormente, en este estudio detectamos que alrededor del 3.6% de los pacientes con infección congénita presentaban genotipos mixtos de glicoproteína B. Estas infecciones mixtas han sido raramente descritas hasta el año 2012 ^{276,277,284,285}, de hecho, otros autores no han observado este fenómeno ^{37,78,100} en infección congénita. Posteriormente a ese año, se han referido tasas de infección mixta que variaban desde el 2% ²⁸⁵, 7.5% ²⁷⁷, 12.5% ⁸⁰, 16% ²⁷⁶ hasta el 45 % ⁸². Esta mayor frecuencia la achacaron a que el porcentaje tan bajo obtenido en otras series era debido al pequeño número de muestras estudiadas en infección congénita, así como la

DISCUSIÓN

posible selección de un único genotipo al obtener las cepas a partir de aislamientos de cultivos virales ⁸². Por otro lado, quizás podríamos haber encontrado genotipos mixtos que se presentaban en poblaciones menores si hubiéramos hecho una aproximación algo más estricta mediante secuenciación de un número importante de clones, ya que un estudio reciente ²⁸⁶, que utilizaba técnicas de pirosecuenciación, evidenció la compleja mezcla de genotipos en muestras de orina de tres recién nacidos con una variabilidad intrahospedador del 0.2% comparable con los virus ARN. Además, algunos autores explican este bajo porcentaje por el tipo de muestra utilizada, como por ejemplo, en el caso de un grupo mejicano, el cual observaron que en la leche materna los genotipos se presentaban de manera mixta en el 53.3 %, mientras que en el caso de la sangre del recién nacido sólo se detectaba en el 6.6% de los casos ⁷⁹. En nuestro estudio, todos los pacientes que tenían más de una muestra y diferente tipo de muestra presentaron el mismo genotipo en todas ellas, en su contra, un estudio en el que se analizaban diferentes compartimentos como saliva, sangre y orina mostraba diferentes variantes genómicas, detectándose incluso genotipos mixtos ²⁸³.

A uno de los pacientes, no se le pudo asignar el genotipo de glicoproteína B, esto pudiera ser debido a la presencia de algún inhibidor en la muestra que impidió la amplificación, ya que el genotipo de glicoproteína H tampoco fue determinado.

Aunque la glicoproteína H es una importante diana, no sólo para los anticuerpos neutralizantes, si no para la entrada viral en las células, la literatura acerca de los diferentes genotipos presentes en infección congénita es escasa. Este estudio confirmó que ambos genotipos podrían ser transmitidos de madre

a hijo, al igual que otros estudios realizados previamente^{82,92,275,283}. El genotipo de glicoproteína H más prevalente fue gH1 (55.35%), tasa similar a la referida por Pati et al⁸² (56%), e inferior a un estudio japonés donde la frecuencia era superior al 60%²⁸⁷. Esta asiduidad fue superior a la expuesta en Estados Unidos²⁸³ (39%), y en diversos trabajos europeos llevados a cabo en Holanda y Polonia, en los que era del 38%²⁷⁵ y 40.4%⁹², respectivamente. Sin embargo, cuando las muestras eran estratificadas en niños o gestantes, la prevalencia encontrada se trastocaba, ya que el genotipo más asiduo en niños resultaba ser gH2 (53.8%), y en embarazadas, gH1 (88.2%). De tal manera, que cuando la comparábamos con las investigaciones previamente mencionadas, este dato era inferior a los estudios holandés (62%)²⁷⁵ y americanos (59% y 61%)^{82,283}, y superior al japonés (~25%)²⁸⁴ o polaco (45.2%)⁹².

Los genotipos mixtos de glicoproteína H han sido descritos previamente en uno de los estudios americanos, en el que se establecía una tasa del 15% en un período de estudio de 8 años⁸². Porcentaje similar al referido en el estudio polaco (14.3%), donde no constaba el período de estudio, y en el que en 5 pacientes se detectaban genotipos mixtos en un tipo de muestra (orina o sangre, no especificado), y un único genotipo en otra muestra analizada, sin que predominara ningún genotipo en cada uno de los compartimentos estudiados⁹². Ninguna mezcla de genotipos fueron reseñados en sendos estudios de Ross et al²⁸⁴ y De Vries et al²⁷⁵ entre los años 2007-2009 y 2009-2011, respectivamente. Sin embargo, el estudio americano observó que en un paciente con orina y saliva, se presentaban diferentes genotipos, e incluso cabía destacar que en aquellos en los que los pacientes además tenían una

tercera muestra como sangre en gota seca no se detectaba el genotipo de gH²⁸³, por lo que nos llevaría a sugerir que este tipo de muestra podría no ser muy útil en el diagnóstico, argumentando que las cargas virales son mucho más bajas en sangre que en orina, y que este tipo de muestra podría dar lugar a la pérdida de casos de infección congénita debida una falta relativa de sensibilidad. De acuerdo con esto, otros trabajos no fueron capaces de asignar genotipos cuando se utilizaba este tipo de muestra^{76,288}. En nuestro caso, a los siete pacientes diagnosticados mediante tarjeta de pruebas metabólicas les fueron asignados tanto el genotipo de gB y gH. La dificultad en la detección de ADN es debida a la pequeña cantidad de sangre seca utilizada (50 µl), por lo que optimizar la extracción de ADN como han hecho otros trabajos, ha logrado determinar el genotipo en aproximadamente en el 75-80% de las muestras analizadas²⁷⁵. En nuestro caso, un único niño (1.8%) presentó un genotipo mixto. Estas diferencias en la frecuencia tanto de genotipos únicos o mixtos, al igual que con los genotipos de glicoproteína B, podrían ser explicadas por una posible selección de la cepa viral en los cultivos celulares, por la incapacidad de detectar las mismas por la diferente metodología usada, o por el diferente tropismo celular (el cual es conferido por determinados genes presentes en las cepas clínicas, lo que podría explicar esas diferencias en el compartimento biológico de diferentes cepas virales).

Recientemente, diversos estudios han mostrado como un homólogo del receptor del factor de necrosis tumoral, como el ORF UL144 de CMVh tiene funciones inmunomoduladoras, y por tanto, podría jugar un papel en la patogénesis del mismo. En base a ese papel crítico del gen UL144, es razonable postular que los polimorfismos en dicho gen, podrían afectar al

comportamiento de la infección por CMVh. Al igual que con las glicoproteínas B y H, parece ser que los genotipos de UL144 presentan un origen demográfico y geográfico. En este estudio, todos los genotipos de UL144 en infección congénita fueron detectados, salvo los recombinantes A/B y B/C. El genotipo de UL144 más prevalente fue UL144 B (41.5%), y todos los genotipos encontrados circularon a lo largo del período del tiempo, a excepción del UL144 A en los años 2005-2007 y el UL144 A/C en los años 2008-2010. Además en general, ninguno predominaba a lo largo del período estudiado, salvo el genotipo UL144 B entre los años 2005-2007 y 2011-2013. Esto difiere con lo referido por un estudio irlandés en el que todos los genotipos fueron detectados salvo B/C, el genotipo predominante fue UL144 A (33.3%), y ninguno de ellos predominaba durante el período estudiado que constaba de 2 años (2006-2007) ²⁸⁹ en 29 muestras de orina de niños con infección congénita. Nuestro patrón de frecuencia fue similar al mostrado por un artículo americano en el que se incluían 66 mujeres embarazadas, las cuales se encontraban dentro de un programa de diagnóstico prenatal entre los años 1990 y 2003. Este mostraba que UL144 B estaba presente en el 44.6% de los líquidos amnióticos secuenciados y al igual que nosotros, los genotipos UL144 recombinantes como A/B y B/C no se encontraban representados ³⁴. De hecho, estos datos que obtuvieron, los compararon con un estudio realizado por ellos previamente, donde observaron que UL144 B acontecía en aproximadamente el 75 % de la población estudiada con algún cambio en el orden de frecuencia, siendo la población estudiada en este último fundamentalmente afroamericana, y que esa diferente distribución, podría ser debida a la diferente sensibilidad genética de las 2 poblaciones comparadas. En el continente europeo, aunque la tasa de

DISCUSIÓN

prevalencia para el genotipo B fue inferior a nuestro caso, un estudio francés que incluyó 38 muestras de líquido amniótico de embarazadas procedentes de París y alrededores, así como de Isla Reunión en un período de 2 años (2001-2002), refirió que UL144 B (34%) y UL144 C (32%) eran los genotipos más prevalentes ⁵². Aproximadamente el 90% pertenecía a UL144 B cuando la población estudiada era del Centro de Polonia ¹⁰⁰. En países asiáticos como Japón, se ha descrito una tasa de prevalencia del genotipo UL144 B del 40%, similar a la expuesta por nosotros ³⁷.

Muchos de las series arriba mencionadas detectaron genotipos recombinantes de UL144 ^{34,52,82,100,289}, salvo el estudio japonés ³⁷ que no detectó ninguno. En este estudio, UL144 A/C representó el 15.09% de la población estudiada, y el resto de genotipos recombinantes A/B y B/C no fueron identificados. De hecho, el genotipo UL144 B/C hasta lo que llega nuestro conocimiento, no ha sido detectado en infección congénita, pero si el genotipo UL144 A/B, con porcentajes de aparición del 4% ¹⁰⁰, 5% ⁵², 7.4 % ²⁸⁹ y 9% ⁸². La representación del genotipo UL144 A/C fue superior en este estudio a la especificada en otros trabajos, cuyas tasas variaban desde el 3% ⁵², 3.7% ²⁸⁹, 5.4% ³⁴ hasta el 10% ⁸². Este último trabajo estadounidense fue el único que refirió la presencia de genotipos mixtos de UL144 en el 10% de las muestras estudiadas ⁸². Para solventar este problema, estos autores recurren a la amplificación de esta región mediante la clonación de 10 colonias por muestra, y la posterior secuenciación de las mismas, lo que explicaría ese 10% de genotipos mixtos.

5.2 COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE ESTOS GENOTIPOS EN UN GRUPO CONTROL DE PACIENTES PEDIÁTRICOS EN LOS QUE SE HA DOCUMENTADO PRIMOIINFECCIÓN POR CMVh Y EN RECEPTORES DE TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO

La infección primaria es normalmente asintomática en los pacientes inmunocompetentes, persistiendo el virus en un estado latente con excreción intermitente del virus en orina, saliva, secreciones genitales y leche. En orden a establecer un grupo control, decidimos incluir una población constituida por niños mayores de 3 meses con un diagnóstico de infección postnatal por CMVh. En este trabajo, todos los genotipos mayoritarios de glicoproteína B fueron detectados en este tipo de población. El genotipo gB1 fue el más frecuente, y estuvo presente en más del 50% de los niños estudiados. Al igual que la distribución de los genotipos en infección congénita, se observó que todos los genotipos circulaban a lo largo de los años, salvo gB4. Aunque, en infección congénita gB3 y gB2 predominaban en un determinado periodo de tiempo, en infección adquirida gB1 fue el más asiduo durante todos los años de estudio. Pudimos observar, que cuando comparábamos la frecuencia de ambas poblaciones, de manera significativa, el genotipo 3 de glicoproteína B era más habitual en infección congénita, mientras que el genotipo 1 en infección adquirida. Este hecho coincide con un estudio japonés previo, en el que se incluyeron 64 niños, de los cuales 31 fueron diagnosticados de infección adquirida con edades comprendidas entre los 6 meses y 2 años y medio ³⁷. Sin embargo, posteriormente, un estudio holandés realizado entre los años 2007-2010 y con mayor número de sujetos (n = 58) mostró que, a pesar de que gB1 era el más habitual en infección adquirida, la distribución de genotipos en ambas poblaciones era similar, aunque existían diferencias en el orden de

DISCUSIÓN

frecuencia (infección congénita: gB1 46%, gB3 23%, gB2 y gB4 15% *versus* infección adquirida: gB1 46%, gB2 21%, gB3 19% y gB4 3 %) ⁸¹.

El genotipo gB1 ha sido descrito en la mayoría de los estudios como el genotipo más prevalente en infección adquirida. Nuestra tasa fue similar a otros trabajos realizados en India (41.6%) ²⁷⁹, Holanda (46%) ⁸¹, Francia (57%) ²⁹⁰, Estados Unidos (57%) ⁵⁰ y Polonia (63.5%) ²⁷⁶. De acuerdo con este último trabajo ²⁷⁶ y al estudio japonés ³⁷, sugerimos que podría existir preferencia de un genotipo u otro en ser causante de infección congénita o adquirida.

Se han descrito frecuencias de gB1 de más del 85% en el continente asiático (Japón, Thailandia) ^{37,291-293}. En esta zona geográfica, se observa el número limitado de gB2 y gB4 ²⁹¹⁻²⁹³, e incluso la no presencia de los mismos ³⁷ en población pediátrica, salvo lo referido por un trabajo indio, en el que el genotipo 2 fue el más asiduo (50%) y gB4 no estuvo presente ²⁷⁹. Esto difiere con lo mostrado en nuestro trabajo, donde encontramos tasas de frecuencia para gB2 y gB4 de 22.5% y 2.5%, respectivamente, similares a Holanda (21% y 5%) ⁸¹ y diferentes a Francia (5.7% y ~ 13%) ²⁹⁰ y Polonia (15.4% y 28.8%) ²⁷⁶, donde gB4 era más habitual que gB2, lo que nos sigue confirmando que la distribución de los genotipos es dependiente geográficamente también en infección adquirida.

La amplia circulación de cepas de CMVh observada en niños, con eventos de recombinación, junto con la selección de determinados clones sugiere una evolución dinámica de la población viral de CMVh. Por tanto, la clasificación genotípica puede ser más compleja ²⁹⁰, y la presencia de genotipos mixtos no podía ser menos en infección adquirida. En este estudio, las infecciones mixtas se presentaron con mayor frecuencia en infección

DISCUSIÓN

adquirida (10%) que en infección congénita (3.6%). Este hallazgo fue inferior al observado previamente por Zawilinska et al ²⁷⁶ donde las infecciones mixtas ocurrían en el 31% de los niños, principalmente en niños de mayor edad, o como Grosjean et al en el 15% ²⁹⁰. Sin embargo, fue superior a lo referido por un trabajo tailandés (5.4%) donde se incluyeron 71 niños VIH positivos y negativos de un orfanato ²⁹². Otros países como Japón ³⁷, India ²⁷⁹, u Holanda ⁸¹, reseñaron la ausencia de genotipos mixtos. Al igual que en infección congénita, esta diversidad de resultados pueden ser debidas entre otras causas a la metodología aplicada.

Como hemos mencionado anteriormente, el CMVh infecta tanto a pacientes inmucompetentes como a inmunosuprimidos. Es uno de las mayores causas de morbilidad y mortalidad entre pacientes inmunosuprimidos, tales como los receptores de trasplante de órgano sólido, pacientes con enfermedad hematológica maligna o bien, con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). La infección por CMVh se desarrolla entre el 50% y 90% de los receptores de trasplante de órgano sólido.

Además de pacientes con infección congénita y adquirida, incluimos una población adulta compuesta de 62 pacientes receptores de trasplante de órgano sólido. De acuerdo con otros trabajos previos, encontramos que la infección por CMVh con genotipos de glicoproteína B 1, 2, y 3, era relativamente común y ocurría en similares proporciones, donde el genotipo 4 era poco habitual. Aunque algunos estudios encuentran una mayor predominancia de gB1 que nuestro trabajo, con tasas de entre el 45-84.3% ^{72,275,294-296}, aproximadamente el 40% de las cepas que estudiamos presentaron genotipo 1. Al igual que en las poblaciones de infección congénita y adquirida,

todos los genotipos de glicoproteína B se encontraron representados, gB2 (26.5%), gB3 (24.7%) y gB4 (1.8%). Este hallazgo es compatible con otros trabajos en los que se observa que gB1 y gB3 son los genotipos más frecuentes en receptores de trasplante ^{275,295-300}. Diversos autores a lo largo de todos los continentes describen el genotipo 1 como el más habitual, este es el caso de Francia (28.9%) ²⁹⁷, Méjico (30%) ³⁰¹, República checa (30%) ³⁰², Canadá (38%) ²⁹⁹, Brasil (39%) ²⁹⁴, Estados Unidos (48.4%) ³⁰³, Holanda (54%) ²⁷⁵, Kuwait (59%) ⁷², China (52.9 y 60%) ^{295,300} y Taiwán (84.3%) ²⁹⁶. Así mismo, el genotipo gB3 ha sido descrito como el más habitual en Canadá (36.2%) ³⁰⁴ o China (38.6%) ²⁹⁸, y el genotipo gB2 en receptores de trasplante renal en Italia (40%) ³⁰⁵. También, el genotipo gB2 ha sido referido como el más prevalente en un trabajo checo en población VIH ³⁰⁶, así como en un estudio polaco que incluía a pacientes con infección congénita asintomática, sintomática y trasplantados renales, observando en las tres poblaciones tasas de entre el 93 y 100% ¹⁰⁰ para este genotipo.

Hasta la fecha, no está muy claro si la diversidad de la población de CMVh en un paciente inmunocompetente se debe a una infección primaria por diferentes cepas, o bien se debe a reinfecciones consecutivas durante la vida de la persona, tal como se ha sugerido en el artículo italiano mencionado anteriormente ³⁰⁵. Los resultados de nuestro estudio muestran que en algunos de los pacientes trasplantados en los que teníamos más de una muestra era normal que presentaran diferentes genotipos. En este estudio un 6.8% de los pacientes presentaron genotipos mixtos, tasa inferior a la referida en infección adquirida y superior a la referida en infección congénita. Diversos trabajos han establecido diferentes valores de prevalencia de infección mixta. Nuestra

DISCUSIÓN

frecuencia fue comparable con la observada en receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos en Brasil (6%) ²⁹⁴ y en receptores de trasplante hepático en Canadá (6.9%) ³⁰⁴, pero inferior a la referida por Estados Unidos (2.5%) en trasplantados de médula ósea ³⁰³ y por Kuwait (2.3%) en trasplantados renales ⁷², e incluso se ha descrito la no presencia de infección mixta ³⁰⁵. Gorzer et al observaron que el 50% de los receptores de trasplante pulmonar austríacos presentaban infección por genotipos diferentes ³⁰⁷, sin embargo la población estudiada era muy limitada. Además de este grupo, cabe destacar otras series con un mayor número de sujetos, las cuales han mostrado tasas del orden del 16.8 % al 36% ^{275,295,297,298,300,301,306}. Estos artículos incluían en su mayoría receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos ^{275,295,297,298,300,301,306}, salvo 2 de ellos ^{275,297} en los que participaban además receptores de trasplante renal ^{275,297} o hepático ²⁷⁵. De Vries et al ²⁷⁵ incluye 39 muestras de plasma pertenecientes a trasplantados con más de 1000 copias/ml en el periodo de 2009 a 2011, y encuentran múltiples genotipos en el 36% de los pacientes, de los cuales el 28% fueron dobles y el 8% triples, lo que les sugirió ante tal proporción que la metodología usada por ellos era más sensible para detectar genotipos mixtos, y por tanto, el riesgo de amplificación competitiva de los múltiples genotipos por el uso de sondas específicas, en vez de primers genéricos, desaparecía. Esto fue una de las razones por las que este artículo nos sirvió como cabecera en cuanto a primers y sondas específicas de genotipo de glicoproteína B y H por su mayor sensibilidad para detectar genotipos minoritarios frente a la secuenciación convencional. Previamente, un estudio francés concluyó que la prevalencia de los genotipos de glicoproteína B difería si las muestras eran obtenidas de

diferentes tejidos ²⁹⁷. Este estudio mostró que las infecciones mixtas eran más prevalentes en sangre total (34.4%) que en plasma (15.6%), así como en leucocitos purificados, donde aproximadamente en el 75% de las muestras presentaban 3 ó 4 genotipos, pero no en sangre total ni en plasma. En nuestro caso, de manera paralela investigamos la presencia de los genotipos de glicoproteína B en sangre y plasma, y este fenómeno no fue observado.

En este estudio, analizamos si la distribución de genotipos de glicoproteína H era similar en niños con infección congénita, infección adquirida, y receptores de TOS. Al igual que con infección congénita, la literatura sobre el genotipo de gH en infección adquirida es escasa. Aproximadamente el 55 % de los niños con infección postnatal eran gH1, y no existieron diferencias en la distribución del genotipo de gH entre infección congénita y adquirida. Esta frecuencia fue similar a la referida por Grosjean et al para gH1 (51.5%) cuando analizaban 212 muestras de saliva pertenecientes a diferentes niños franceses que acudían al servicio de urgencias o guarderías ²⁹⁰, y ligeramente inferior a dos trabajos japoneses en los que las tasas eran del 71% ³⁰⁸ y 60.8% ³⁰⁹. El objetivo de uno de los artículos fue el desarrollar una PCR a tiempo real con el fin de obtener un método más rápido y más sensible a la hora de detectar el genotipo de gH, para ello incluyeron un número elevado de muestras de orina (n=203) ³⁰⁸. Los dos estudios mostraron la ausencia ³⁰⁹ o escasísima presencia (~1%) ³⁰⁸ de infecciones mixtas. En contraposición a estos hallazgos, Paradowska et al ¹⁰⁰ describieron que el genotipo gH2 fue el más prevalente en todos los grupos que estudiaban, entre los que se incluían 42 pacientes con infección congénita, 93 con infección adquirida, 22 VIH y 33 trasplantes renales. Describen un 43.7% de gH2 y 33.3% gH1 en infección

DISCUSIÓN

adquirida, mientras que en trasplante 25.4% gH1 y 38.2% gH2, respectivamente, reseñando que no existen diferencias en la distribución de los genotipos. A pesar de que en nuestro estudio el genotipo más habitual era gH1 cuando se estudiaban conjuntamente recién nacidos y embarazadas, gH2 era más frecuente en niños (53.8%) y gH1 (88.2%) en gestantes cuando los estudiábamos por separado. En el trabajo polaco, la tasa de genotipos mixtos fue mayor en inmunodeprimidos (36.4%) y en infección postnatal (23.7%) que en infección congénita (14.3%). De acuerdo con esto, en nuestro estudio mostramos un 5% y 31.4% de infecciones mixtas en infección adquirida y en trasplantados, respectivamente, siendo más frecuente este fenómeno en estas poblaciones que en infección congénita (1.8%). Este hallazgo también fue referido por de Vries et al detectando infecciones mixtas en más del 30% de las muestras de plasma pertenecientes a receptores de precursores hematopoyéticos, renales y hepáticos, sugiriendo que esta tasa podría ser incluso mayor debido a que a lo mejor en las muestras con cargas virales por debajo del límite de detección, podrían no detectarse estas infecciones mixtas²⁷⁵. Nuestra alta frecuencia, así como la del trabajo holandés²⁷⁵, también pueden ser debidas a que la alta proporción de D+/R+ fue alta (87.1% *versus* 71.8%). La distribución de los genotipos de glicoproteína H de las muestras de infección por CMVh en trasplante fue gH1 (35.8%) y gH2 (29.6%) en nuestro estudio. Esta tasa fue inferior a la referida por Madi et al (71%)⁷² que muestran el genotipo H1 como el más prevalente entre los pacientes receptores de trasplante renal en Kuwait. Este resultado y el nuestro contrastan con un estudio holandés²⁷⁵, donde la frecuencia de distribución del genotipo de glicoproteína H era similar entre trasplantados de precursores hematopoyéticos

DISCUSIÓN

²⁷⁵, renales ²⁷⁵ y hepáticos ²⁷⁵ (~ gH1 50% *versus* gH2 50%). A diferencia de nuestro estudio y el trabajo holandés, el estudio kuwaití no refirió ningún genotipo mixto de glicoproteína H.

Las cepas de CMVh con cualquier combinación de genotipos de UL144 pudo observarse en los niños con infección adquirida, a diferencia de UL144 A/B presente en infección adquirida (2.5%) y ausente en infección congénita. La distribución era algo diferente entre infección adquirida (B=A/C>A>C>A/B) e infección congénita (B>C>A>A/C), aunque no hubo diferencias significativas en la distribución de genotipos de UL144. El genotipo más prevalente en ambas poblaciones fue UL144 B, aunque la proporción de este fue inferior en infección adquirida (30% *versus* 41.5%). Este hallazgo ha sido previamente referido en Francia ⁵², Estados Unidos ⁴⁹⁻⁵¹ y Holanda ⁸¹. Picone et al ⁵² incluye 38 pacientes con infección congénita y 30 receptores de trasplante de órgano sólido o médula ósea, donde observan que este genotipo es el más prevalente con una tasa muy similar a la nuestra (infección congénita 34% *versus* trasplantados 37%), no encontrando UL144A/B en trasplantados. Sin embargo, nuestra proporción y la del estudio francés ⁵² y holandés ⁸¹ (44% infección adquirida), fueron inferiores a las establecidas por los estudios estadounidenses, en el que refieren frecuencias de entre el 51 y 69%. Esto difiere con el estudio de Waters et al ²⁸⁹, un trabajo irlandés en el que la población de estudio al igual que nosotros, constaba de pacientes con infección congénita, postnatal y adultos (trasplantados, VIH, y pacientes en diálisis o con infecciones crónicas del tracto respiratorio). Estos encuentran que el genotipo más prevalente era UL144A en infección congénita (33.3%) y adquirida (42.1%), y el segundo UL144B (29.6% y 31.6%), pero no en adultos, donde

DISCUSIÓN

UL144B era el más prevalente (39.5%) y el segundo era UL144A (31.5%), siendo UL144C el menos frecuente y los genotipos recombinantes raros. Alternativamente, las prevalencias de los genotipos A en nuestro grupo control fueron inferiores a las observadas por los estudios estadounidenses y francés: A (22.4% versus 4%⁵⁰, 22%⁵¹ y 33%⁵²) y superior al trabajo holandés (18%)⁸¹. Sin embargo, las prevalencias de genotipo UL144C fueron inferiores a la del estudio francés y holandés (12.5% versus 27% y 33%)^{52,81}, y superiores a las de Estados Unidos (9%⁵¹ y 10%⁵⁰). Cabe destacar que en nuestra población de infección adquirida, UL144 A/C fue uno de los genotipos más prevalentes junto con UL144B (30%), esta frecuencia fue superior a las reportadas por los trabajos que hemos mencionado anteriormente (3%⁵², 4%⁸¹, 12%⁵⁰). A diferencia de nosotros, Lurain et al⁵¹ no describen UL144 A/C en aislamientos de CMVh procedentes de receptores de trasplante, VIH positivos y un niño, al igual que Waters et al²⁸⁹ en infección adquirida, detectándolo solamente el trabajo irlandés en infección congénita (3.7%), y en infección adulta (2.6%). UL144 A/B estuvo presente en el 8.8%, una tasa superior a nuestro grupo control y a lo establecido por el resto de trabajos (2-5%)^{49,50,52,81}, aunque inferior a la referida por Waters et al²⁸⁹ en infección adulta con una prevalencia del 10.5%, y similar a nosotros en infección adquirida (2.5%), a pesar de que ellos si describen este genotipo en infección congénita (7.4%) y nosotros no. En contraposición con estos artículos y el nuestro, en el que en una y/o otras poblaciones encuentran algún genotipo recombinante, Yan et al no detectan ninguno en su población de niños japoneses con infección congénita y postnatal³⁷. En todos los artículos que hemos mencionado, no se encontraron diferencias significativas cuando se comparaban la distribución de infección

congénita y el grupo control (infección adquirida o adulta). Hasta lo que conocemos, solo hemos encontrado un artículo que si encuentran diferencias atendiendo a esta distribución de genotipos de UL144 ¹⁰⁰. Este trabajo fue realizado en Polonia donde incluían pacientes con infección congénita, y como grupo control, receptores de trasplante renal. Al igual que el estudio japonés, el genotipo más habitual era UL144B en los sujetos estudiados (88% infección congénita y 56% trasplantados), y los genotipos recombinantes no estuvieron presentes en el grupo control, pero si en infección congénita (A/B 4%).

La información obtenida en cuanto a gB, gH y UL144 sugiere que las cepas recuperadas en infección congénita reflejan las cepas circulantes en España, a pesar de que UL144 A/B no se detectó en esta población, pudiendo ser debido a que quizás nuestro número de pacientes estudiados fue demasiado pequeño para determinar la existencia de estas variantes.

5.3 RELACIÓN ENTRE LOS GENOTIPOS ENCONTRADOS EN LOS PACIENTES CON INFECCIÓN CONGÉNITA Y LA SEVERIDAD DE LAS MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La infección por CMVh es la principal causa de infección congénita y la fuente de infección más común de daño a nivel de sistema nervioso central y pérdida neurosensorial en los Estados Unidos ¹²⁶. La evolución de la infección congénita es altamente variable. Alrededor del 10% al 15% de los niños infectados manifiestan síntomas severos al nacimiento, principalmente retraso psicomotor y pérdida neurosensorial, y entre el 85% y el 90% restante son asintomáticos al nacimiento, de los que el 10 al 15% desarrollarán pérdida neurosensorial y déficits neurológico a largo plazo. Como ya ha sido

mencionado en la introducción, CMVh presenta uno de los genomas más grandes dentro de los virus humanos. Su genoma es altamente conservado, pero hay determinados genes que son altamente variables. El estudio del genoma viral puede proporcionarnos información de utilidad para encontrar marcadores de virulencia que se asocien a las manifestaciones clínicas más severas, aunque todavía hoy en día la significación clínica de la epidemiología molecular de CMVh es controvertida. Existe un enorme interés en esclarecer que es lo que hace que determinadas cepas de CMVh tengan diferente potencial patogénico atendiendo a la variabilidad genética descrita. Este interés al que han contribuido los diferentes estudios sobre vacunas, en los que se ha observado que cepas de laboratorio adaptadas como AD169 y Towne, se encontraban atenuadas cuando se administraban a diferentes pacientes sometidos a vacunación, mientras que la cepa Toledo era capaz de causar enfermedad cuando se administraba a pacientes seropositivos³¹¹. En general, no hay acuerdo en si hay o no relación entre los diferentes genotipos y enfermedad. Parte de la inconsistencia de los resultados publicados, se debe a la heterogeneidad de los sujetos estudiados, a la falta de grupos control adecuados, y al pequeño número de pacientes. También han sido descritas las infecciones mixtas, lo que hace que sea más difícil establecer dicha relación del genotipo con la patogenia.

La disponibilidad de marcadores para la identificación de recién nacidos con mayor riesgo de desarrollar infección sintomática y/o secuelas, puede tener un impacto significativo en los pasos a dar en cuanto al seguimiento e intervención terapéutica o rehabilitadora para minimizar el daño a largo plazo. Hasta la fecha, solo existe evidencia científica de que la terapia antiviral

contribuye a reducir la pérdida auditiva neurosensorial en pacientes con implicación cerebral. Además, como es de sobra conocido, algunos de los recién nacidos asintomáticos pueden desarrollar secuelas, y los marcadores pronósticos e indicaciones terapéuticas para estos niños se echan en falta. Otros autores han visto como un marcador, la carga viral, la cual parece estar relacionada con enfermedad sintomática al nacimiento y parece ser un factor pronóstico de evolución adversa. En receptores de trasplante de órgano sólido o médula ósea, el determinar la carga viral de manera seriada en sangre completa o plasma determina la toma de decisiones para el inicio y duración de la terapia ¹⁹⁹. Sin embargo, en niños con infección congénita las cargas virales pueden aumentar o disminuir en el mismo paciente de manera impredecible, y la duración de la viremia quizás sea más corta ³¹¹. En nuestro trabajo este tema lo discutiremos en el cuarto y último objetivo de esta tesis.

Diversos países han estudiado en muestras de infección congénita dos tipos principales de genes, los que codifican las glicoproteínas de superficie como gB, gH, gN y gO, y los homólogos de quimiocinas/citoquinas. El presente trabajo se focaliza en la distribución de polimorfismos de glicoproteína B, H y el gen UL144 en una población de niños con infección congénita, gestantes con diagnóstico prenatal de infección congénita, niños con infección postnatal y pacientes trasplantados. Entre los 39 niños con infección congénita, 27 (69.2%) de ellos fueron sintomáticos y 6 (15.4%) asintomáticos. El porcentaje restante se desconocía si presentaban síntomas o no, debido a que las muestras procedían de pacientes de otros hospitales diferentes al nuestro, no teníamos ningún dato clínico de ellos, y por ello fueron excluidos del estudio. Nuestro porcentaje de infección sintomática se encuentra dentro de los valores

identificados por otros trabajos realizados en Europa o Asia, en los que su población no procede de un cribado neonatal previo de CMVh al nacimiento ^{37,81,92,98,100,289,310}, estableciéndose tasas del 56% ¹⁰⁰, 68.7% ³⁷, 77% ⁸¹ 85.7% ⁹², 93.5% ³¹⁰ e incluso del 100% ⁹⁸. Sin embargo, otros estudios llevados a cabo en Estados Unidos refieren tasas inferiores de aproximadamente el 28% ⁸² y 35% ⁹⁷. Pati et al ⁸² y Ross et al ²⁸³, autores pertenecientes a uno de los grupos más importantes en cuanto al estudio del CMVh de Estados Unidos, incluyen pacientes pertenecientes a un estudio multicéntrico denominado CHIMES “Hearing Multicenter Screening Study”, y pacientes procedentes de siete hospitales diferentes que participan en el “National Institute on Deafness and Other Communications Disorders” (NIDCD), esto explicaría que la prevalencia de infección sintomática sea menor al partir de una población sometida a cribado universal de CMVh.

Una gran proporción de recién nacidos con síntomas al nacimiento sufrirán problemas psicomotores y en la percepción de manera moderada o severa. Diferentes estudios prospectivos han mostrado que aproximadamente la mitad de los niños recién nacidos con infección sintomática desarrollarán pérdida neurosensorial, retraso mental y microcefalia ^{33,136}. Los hallazgos de manera temprana que son predictivos de evolución neurológica adversa en niños con infección sintomática incluyen la microcefalia, coriorretinitis, y la presencia de otras anormalidades al nacimiento o en la infancia temprana observadas en pruebas radiológicas. Estos hallazgos radiológicos son anormales en aproximadamente el 50-70% de los niños con infección sintomática al nacimiento. Los hallazgos más habituales son las calcificaciones intracraneales, quistes y vasculopatía lenticuloestriada, apareciendo en

diversas proporciones ³¹². En nuestro estudio, el 51.3% de los pacientes mostraron alteraciones neurológicas en las pruebas de imagen, siendo la alteración de la sustancia blanca (23.1%) y los quistes periventriculares (17.9%) los hallazgos más frecuentes. El 64.1% de los pacientes manifestaron algún tipo de secuela en el neurodesarrollo, donde la afectación auditiva (41%) fue la más habitual, seguida del retraso psicomotor (20.5%), déficit visual (15.4%) y microcefalia (15.4%). Yan et al ³⁷ describen que el 66.6% de los niños japoneses con infección congénita presentaban anormalidades neurológicas al nacimiento siendo la ventriculomegalia o calcificaciones periventriculares (12.1%) la más frecuente. Al igual que nuestro estudio, describen la hipoacusia neurosensorial y el retraso psicomotor como las secuelas más habituales, aunque obtienen prevalencias superiores a las referidas por nosotros, 57.5% y 48.4%, respectivamente ³⁷. De acuerdo con este estudio, Paradowska et al ^{92,98} establecen que el retraso psicomotor era la manifestación más frecuente (55.1%), mientras que la afectación auditiva y el retraso crecimiento uterino fueron las segundas más habituales con la misma prevalencia (43.8%). Además, encuentran que el 68.8% de los pacientes presentaban algún tipo de disfunción neurológica, y dentro de las pruebas de imagen realizadas, el hallazgo más frecuente era los quistes periventriculares (50%). Este último dato es similar al referido por Nijman et al ⁸¹, donde el 54% presentaban este signo, la vasculopatía lenticuloestriada era el segundo más habitual (46%), y donde el retraso de crecimiento uterino se manifestó en el 38.4%, tasa similar a la referida por Paradowska et al y superior a la nuestra (23%). En un estudio de 190 niños con infección congénita sintomática por CMV, el rash petequial y el retraso de crecimiento intrauterino son los únicos

factores que fueron independientemente predictivos de pérdida neurosensorial³¹³. En nuestro caso, sólo el 7.7% presentó rash petequial, frecuencia similar a la de un estudio polaco (7.1%)⁹² e inferior a otras series: 23%⁸¹, 31.2%⁹⁸, y 76%³¹².

La hepatoesplenomegalia ha sido identificado como el síntoma más frecuente, como en el estudio indio de Gandhoke et al⁷⁸ donde establecen una prevalencia del 55.3%. Este, se trataba de un estudio en el que se incluían 375 niños recién nacidos a 6 meses de edad, donde se observó una incidencia elevada de infección congénita del 19.4%, y donde la mayor tasa de positividad se encontraba entre los niños de 1 y 2 meses, y los más sintomáticos entre 0 y 1 mes. Sin embargo, ese amplio intervalo de edades, sin especificar concretamente los criterios de inclusión, nos hace pensar que la población podría constar de pacientes con infección congénita y adquirida, por lo que no sería realmente representativo de infección congénita. Otros estudios pertenecientes al mismo año y posteriores muestran prevalencias superiores a la referida por nuestro trabajo (5.1% versus 30.7%, 33.3%, 37.5%, y 60%)^{81,92,98,312}.

Los parámetros analíticos en los niños con infección congénita sintomática reflejan la implicación de los sistemas retículoendotelial y hepatobiliar, incluyendo hiperbilirrubinemia, trombocitopenia y elevación de las enzimas hepáticas en más de la mitad de recién nacidos sintomáticos. Cabe destacar que aproximadamente el 40% presentó ictericia, el 23% trombocitopenia y las enzimas hepáticas alteradas. Otras series describen tasas similares, inferiores o superiores de ictericia: 7.7%⁸¹, 25%⁹², 34%⁹⁸ y 67%³¹²; inferiores o superiores de trombocitopenia: 8.6%³¹⁰, 37.6%⁹⁸, 46.1%

⁸¹ y 77% ³¹². La colestasis hepática ha sido reseñada en muchos de los trabajos mencionados anteriormente como una de las manifestaciones habituales, sin embargo, sólo uno de ellos describe una tasa similar a la mostrada por nosotros como es el caso de Mao et al ³¹⁰ (22.4%), a diferencia de Boppana et al con un prevalencia del 83% ³¹².

Muchos estudios prospectivos de niños con infección asintomática muestran que aproximadamente la mitad de los niños que desarrollan pérdida neurosensorial presentarán déficit bilateral moderado o severo. Además, se ha descrito que aproximadamente el 5% de estos niños desarrollarán microcefalia y defectos motores, y la coriorretinitis se observará en el 2% ³¹². Cabe destacar que aquellos pacientes que fueron diagnosticados mediante tarjetas de pruebas metabólicas el motivo más frecuente de estudio fue la hipoacusia (71.4%) y el retraso psicomotor (57.1%). Sin embargo, una de las limitaciones de nuestro estudio fue el no seguir la evolución de los pacientes tanto sintomáticos como asintomáticos, y por tanto, desconocemos si estos últimos llegarán a presentar o no secuelas a largo plazo.

La glicoproteína B (UL55) interviene en la adhesión viral y entrada a las células, en la transmisión de célula a célula y en la formación de sincitios. Un número importante de anticuerpos neutralizantes frente a CMVh presentan epítomos frente a gB, y todos los individuos infectados por CMVh presentan anticuerpos anti glicoproteína gB. Por lo que no sorprende que la glicoproteína gB haya sido estudiada con el objetivo de ver si el presentar o no un genotipo determinado de la misma está relacionado con la severidad de las manifestaciones clínicas. Diversos autores han sugerido que ninguno de los genotipos de gB (UL55) están asociados con la evolución de infección por

CMVh ^{81,82,100,275,279,284,313}. En este estudio, encontramos que el presentar quistes periventriculares en las pruebas de imagen realizadas a niños con sospecha de infección congénita fue más frecuente con el genotipo gB2 ($p = 0.05$), y que con el genotipo gB3 no era frecuente presentar afectación motora ($p = 0.02$). Recientemente, el genotipo 3 de UL55 ha sido asociado con manifestaciones severas de CMVh en niños con infección congénita como anomalías neurológicas o pérdida neurosensorial ³⁷. Estos autores reseñan que parte de los datos inconsistentes de otros estudios en los que no se encuentra asociación, podrían ser explicados en parte, a la distribución geográfica y demográfica, a la falta de un apropiado grupo control para comparaciones, y al pequeño tamaño poblacional. Además, el genotipo gB2 ha sido asociado a déficit auditivo y síntomas a nivel del SNC ⁷⁸. Incluso un estudio húngaro ²⁸² y dos estudios chinos ^{277,314}, establecieron que los niños con genotipo UL55 1 presentaban con mayor frecuencia daño hepático o hepatomegalia. A diferencia de estos resultados, las cepas con gB1 ⁷⁶ y gB2 ^{281,282} han sido mostradas como las más prevalentes en infección asintomática. En nuestro estudio, gB3 y gB4 fueron los genotipos más prevalentes en infección asintomática, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas con el resto de genotipos. Entre los niños italianos con infección congénita, la enfermedad por CMVh y el daño a nivel del SNC fue más frecuente en pacientes con gB1 y gB3 comparado con gB2 y gB4, sin embargo, las diferencias no fueron significativas ⁷⁶. A pesar de que algunos autores como hemos mencionado anteriormente sugieren correlación, parece que en general, ninguno de los genotipos de gB son predictores de evolución en infección

congénita, aunque el genotipo 3 es más común en niños con pérdida neurosensorial, y en nuestro caso además gB2.

La patogenia de la pérdida neurosensorial en niños con infección congénita es poco conocida, pudiendo ocurrir en el 22-65% de los niños con infección sintomática por CMVh y en el 6-23% de aquellos que son asintomáticos al nacimiento. Aunque se ha establecido por otros autores que ningún genotipo de gH se encuentra asociado con infección sintomática o pérdida neurosensorial ^{82,275}, un trabajo reciente llevado a cabo por Paradowska et al ⁹² sugieren que otros marcadores de CMVh como gH1 representa un fenotipo más virulento, encontrándose asociado con mayor riesgo de pérdida neurosensorial y mayor carga viral en orina. En nuestro estudio, el presentar manifestaciones oculares fue más frecuente con el genotipo gH2 ($p=0.01$). Este resultado no ha podido ser comparado con otros trabajos ya que la literatura acerca de la asociación de esta glicoproteína y evolución es escasísima. Sólo encontramos un artículo chino en el que se incluyen 102 muestras de orina de niños hospitalizados con serologías positivas para IgM e IgG de CMVh. Este estudio mostró que gH2 fue más común que gH1 en los aislamientos clínicos de pacientes con púrpura trombocitopénica ($p<0.05$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre la distribución de los genotipos de gH en el síndrome de hepatitis infantil, hepatitis anictérica y neumonía ³⁰⁹. En cuanto a las manifestaciones oculares, solo encontramos artículos que estudian los polimorfismos genéticos de glicoproteína B y/o UL128/UL130/UL131A y/o UL144 en pacientes VIH positivos, donde encuentran que gB2 es el genotipo más habitual en retinitis ^{316,317,318}, sugiriendo un posible tropismo neuronal de gB2, y no encontrando

asociación en el resto de genes estudiados; o bien de pacientes inmunocompetentes con endotelitis corneal o iridociclitis donde el genotipo gB1 fue el más habitual en estas patologías y donde la distribución de genotipos fue similar en ambas enfermedades ³¹⁹.

La variabilidad en la secuencia de UL144 fue observada originalmente en 45 aislamientos con bajo número de pases, revelando 3 genotipos principales que se encontraban relacionados con los 4 genotipos principales de UL55 (gB) ⁵¹. Posteriormente, dicha variabilidad fue similar en aislamientos procedentes de niños atendidos en guarderías y niños con infección congénita en Iowa y Texas, pero no se encontró ninguna relación entre gB y UL144, por lo que esto significaba que cualquier genotipo de gB podría estar presente con cualquier genotipo de UL144 ⁵⁰. Muchas series no establecen una asociación entre un genotipo específico de UL144 y la evolución de infección congénita ^{37,51,52,81,82,97,310}. Lurain et al describen la no asociación de un genotipo determinado de UL144 y la evolución, a pesar de que el genotipo más prevalente fue UL144 B (grupo 3) ⁵¹. Bale et al también confirman la no asociación entre los genotipos de UL144 y la evolución de la infección intrauterina por CMVh en un pequeño grupo de niños con infección congénita, sin embargo, la distribución de los diferentes genotipos no se describe en el estudio. ⁵⁰. Otros corroboraron lo descrito por Bale et al ³¹⁰. Mao et al analizó 70 aislamientos de niños chinos donde 58 fueron sintomáticos donde UL144 A era más habitual en daño del sistema nervioso central y colestasis hepática que con otros genotipos, pero no hubo diferencias significativas.

En nuestro estudio, encontramos que UL144 C era más frecuente en gestantes de menor edad y en primigestas de manera significativa ($p = 0.01$),

DISCUSIÓN

mientras que la hipoacusia unilateral fue más habitual con el genotipo UL144 A/C ($p = 0.03$). Sin embargo, UL144 B era el más frecuente en niños con infección congénita y en gestantes con diagnóstico prenatal de infección congénita pero de manera no significativa, presentándose en púerperas de mayor edad ($p=0.04$) y siendo frecuente la esplenomegalia como hallazgo extracerebral en las pruebas de imagen realizadas en las ecografías trimestrales ($p = 0.04$). Además, la edad gestacional en el momento de la infección intrauterina por CMVh ha sido asociada con secuelas más importantes ²³². Los estudios sugieren que las seroconversiones maternas que ocurren al final del primer trimestre y principios del segundo se encuentran asociadas al desarrollo de secuelas más severas con implicación del SNC. En nuestro caso, no pudimos establecer el momento de la infección. La incapacidad de definir concretamente el momento de la transmisión del virus al feto, limita la interpretación definitiva de este estudio y de otros, por lo que dichos resultados deben interpretarse con cautela además de por el número escaso de sujetos estudiados y por la metodología aplicada en UL144, que en este caso fue la secuenciación.

Como se puede observar la asociación del genotipo con la evolución es controvertido. Por ejemplo, una asociación entre los genotipos menos habituales como UL144 A, UL144 C, A/B y A/C, y una peor evolución de la enfermedad fue encontrada en un estudio retrospectivo de niños con infección congénita ($p = 0.04$) ³⁴. El genotipo UL144 C ha sido referido como el más común en niños sintomáticos ($p=0.007$), pero curiosamente no se encontró ninguna relación con la pérdida neurosensorial en el estudio CHIMES ⁸². También, UL144 C se asoció con el término del embarazo en un estudio

italiano en el que se incluían 66 líquidos amnióticos de mujeres embarazadas que formaban parte de un programa de diagnóstico prenatal, y con enfermedad sintomática en recién nacidos ($p = 0.03$), mientras que el genotipo B fue asociado con menos interrupciones del embarazo ($p=0.03$), y con un 20% más de probabilidad de estar presente en los líquidos amnióticos de recién nacidos asintomáticos ⁴⁹. Otras series, observaron que el genotipo UL144 B era identificado entre el 70-100% de los casos asintomáticos siendo más prevalente en infección congénita que en postnatal, mientras que encontraban altos porcentajes de UL144 A y UL144 C en infección sintomática, sin embargo, no pudieron establecer la asociación entre genotipo y evolución ^{97,100,314}. Picone et al ⁵² difirieron en la posible relación genotipo e interrupción del embarazo con lo expuesto por Arav-Boger et al. Al igual que nosotros, confirman que todos los genotipos son transmitidos al feto, pero definen dos grupos en su trabajo, fetos sintomáticos severos y no severos, este último definido por la presencia de un hallazgo extracerebral durante el segundo y tercer trimestre de embarazo. Veintitrés mujeres interrumpieron su embarazo basadas en los hallazgos anormales, pero las cargas virales no fueron determinadas, y de los 11 niños recién nacidos a término, nueve fueron asintomáticos y 2 sintomáticos severos. Este estudio concluyó que todos los genotipos de UL144 se encontraban en infecciones sintomáticas y asintomáticas.

A diferencia de los estudios anteriores que solamente se centraban en la relación entre UL144 e infección sintomática, otro trabajo en niños con infección congénita reveló que los genotipos UL144 A y UL144 C se asociaban a una peor evolución y a una mayor carga viral, cuando además se realizaba el seguimiento de los pacientes entre 12 y 18 meses después de la infección ²⁸⁹.

DISCUSIÓN

Tradicionalmente, las infecciones mixtas han sido observadas en pacientes inmunodeprimidos, pacientes con SIDA y receptores de trasplante. La infección mixta fue detectada en la sangre de 5 de 11 pacientes con trasplante renal, donde todos ellos eran seronegativos antes del trasplante ⁴⁴. Luego, la infección por múltiples cepas en estos pacientes podría haber ocurrido a través de la adquisición de cepas de donantes seropositivos que llevaban consigo y transmitían múltiples cepas de CMVh, o bien, los receptores de trasplante fueron susceptibles a exposiciones múltiples en diferentes momentos. Además, la adquisición de nuevas cepas es un hecho, pudiendo surgir fenómenos de reemplazamiento, siendo los pacientes inmunodeprimidos el reservorio *in vivo* de nuevas cepas tras la recombinación ⁴⁵. Se ha descrito en un estudio que madres inmunes adquirían nuevas cepas durante el embarazo y estas eran capaces de transmitirse ¹²⁹. La infección con nuevas cepas también ha sido identificada en niños que acudían a la guardería ⁷³. También las infecciones mixtas han sido descritas en diferentes tejidos que habían sido analizados al realizar la autopsia de muertes intrauterinas tras una infección diseminada por CMVh ⁴⁹.

El papel de estas infecciones mixtas en la evolución de la enfermedad aún se encuentra por definir, aunque una asociación entre infección mixta y evolución ya ha sido descrita previamente en pacientes trasplantados (correlacionado con una mayor carga viral) ^{67,68,297}, sugiriendo una mayor patogenicidad con la presencia de genotipos mixtos. Se ha descrito una alta variabilidad intrahospedador y la existencia de múltiples genotipos en muestras de orina de recién nacidos con infección congénita ²⁸⁶. Pati et al ⁸² observan infección mixta en 19 pacientes sintomáticos y 40 asintomáticos, no

encontrando una asociación entre síntomas e infección mixta ($p = 0.43$). En nuestro caso como hemos mencionado en anteriores apartados, las infecciones mixtas fueron mucho más prevalentes en infección adquirida y trasplante que en infección congénita ($<2\%$). Es posible que la infección mixta ocurra de manera más habitual en los niños que hemos estudiado y que jueguen un papel importante en la patogénesis de la infección congénita por CMVh, ya que la asociación encontrada en inmunodeprimidos combinada con la presencia de genotipos mixtos en muertes fetales podría llevarnos a especular sobre dicha asociación.

5.4 ASOCIACIÓN ENTRE ALGUNO DE LOS GENOTIPOS Y LA PRESENTACIÓN DE CARGAS VIRALES ELEVADAS

Los estudios de la historia natural de la infección congénita por CMVh demostraron que los niños sintomáticos excretaban mayores cantidades de CMVh en la orina que los niños asintomáticos. Debido a que la monitorización de la carga viral en sangre periférica es útil en el manejo de las infecciones invasoras por CMVh en pacientes inmunodeprimidos, se sugirió que la medida de la carga viral podría identificar niños con infección congénita con un riesgo mayor de secuelas. Un estudio en el que uno de los objetivos era establecer la relación entre genotipo de glicoproteína B y carga viral en pacientes sometidos a trasplante hepático, mostró que no existía tal asociación, sin embargo, la única relación que obtuvieron fue que todos los pacientes con infección mixta desarrollaban enfermedad por CMVh ³⁰⁴. De acuerdo con esta observación, Coquette et al indicaron que entre los pacientes con infección mixta, el 94% desarrollaban enfermedad, destacando que aquellos que presentaban

DISCUSIÓN

infecciones mixtas parecían estar más inmunodeprimidos ²⁹⁷. Recientemente, un estudio de receptores de trasplante de órgano sólido con enfermedad por CMVh y una alta prevalencia de infección por genotipos mixtos, indicó que el genotipo de glicoproteína B no influía en la cinética de la carga viral o la respuesta clínica a la terapia ²⁹⁹. Otro estudio observó en una población de receptores de trasplante de precursores hematopoyéticos, que el presentar gB1 estaba asociado con menores cargas virales y síntomas más leves, pero con una mayor tasa de rechazo agudo que de enfermedad ($p=0.067$), el presentar gB3 venía ligado con menor pancitopenia ($p=0.075$), y con gB2 existía una peor evolución con mayor tasa de afectación de órganos, y una menor respuesta a la terapia antiviral, pero no se encontraron diferencias significativas ³⁰². Un estudio japonés no encontró diferencias significativas entre los genotipos de gB. Además el nivel de ADN se correlacionó bien con el número de células positivas detectadas por inmunofluorescencia ²⁹⁵. Por último, un estudio polaco realizado en receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos, observó que no existían diferencias significativas en la carga viral cuando se comparaban infecciones por genotipos únicos y mixtos ²⁷⁶. En cuanto a los niños con infección congénita, Pati et al describen que no existieron diferencias significativas entre las cargas virales de genotipos (gB, gH, gN, UL144, y US28) únicos y mixtos cuando se estudiaban las salivas de 79 niños de la cohorte CHIMES ($p=0.93$) ⁸².

En nuestro trabajo, no se llevó a cabo la determinación de carga viral en orina ni en saliva. Sólo tuvimos disponibles las cargas virales de algunas sangres de tarjetas de pruebas metabólicas, líquidos amnióticos, sangres fetales, y sangre total de trasplantados. En cuanto a los 3 primeros tipos de

DISCUSIÓN

muestra no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes genotipos de glicoproteína B, glicoproteína H y UL144. Esto podría ser debido al escaso número de pacientes incluidos que no nos permitió comparar entre todos los genotipos. En el caso del trasplante, el infectarse con una cepa gB1 o gB2 estuvo asociado a presentarse la infección más anticipadamente, mayor valor de carga viral y antigenemia frente a gB3 o gB4. Atendiendo al genotipo de glicoproteína H, el infectarse con una cepa gH1 estuvo asociado a presentarse la infección de manera más anticipada tras el trasplante a diferencia de gH2 y gH1-gH2. Mientras que el presentar gH2 estuvo asociado a mayores cargas virales en plasma frente a gH1 y gH1-gH2.

Diversos estudios en infección congénita sugieren que las cargas virales en sangre y orina pueden ser importantes marcadores de enfermedad severa por CMVh ^{92,315,289,320}. Sin embargo, un estudio posterior que investigaba 135 niños con infección congénita demostró que no existía relación entre la carga viral dentro de los primeros meses de vida y entre niños con o sin pérdida auditiva neurosensorial ³²⁰. Un trabajo confirmó que los niños sintomáticos presentaban niveles mayores de carga viral en orina y sangre cuando se comparaba con los niños asintomáticos ³⁶. Además, se ha documentado que los niños con infección postnatal presentaban en orina cargas virales inferiores a las presentes en infección congénita, reseñando que esta diferencia era independiente de los genotipos ²⁴². Yan et al no encuentran relación entre el genotipo de glicoproteína B y la carga viral en orina y sangre de cordón umbilical, a pesar de que gB3 era el genotipo prevalente, incluso tampoco con los otros genes estudiados (UL144,UL146), lo que fue consistente con estudios previos que describen la ausencia de dicha relación con gB y UL144 ^{34,281}.

DISCUSIÓN

Recientemente, un estudio holandés no encontró tampoco asociación entre genotipo, carga viral y desarrollo de secuelas ⁸¹; sin embargo, un estudio polaco sugiere que el presentar el genotipo gH1 está asociado a presentar mayor carga viral en niños con infección congénita o postnatal ⁹², y estos mismos autores en dos artículos posteriores no establecen ninguna relación entre genotipo de gB, UL144 y US28 con la carga viral ^{100,314}. En uno de estos últimos estudios, Paradowska et al no encuentran diferencias significativas entre la carga viral e infección sintomática y asintomática. Además, observan que la carga viral en sangre de recién nacidos es al menos 1.5 veces superior a las madres, por lo que establecen que la inmunidad natural juega un papel importante en el proceso, sugiriendo que un alto nivel de viremia en niños podría sugerir una deficiencia en la inmunidad innata ¹⁰⁰. UL144 B fue asociada con mayores cargas virales en líquido amniótico (≥ 10.000 copias/ml, $p=0.03$) y una peor evolución, donde no existía asociación entre el genotipo y enfermedad sintomática, a pesar de que la carga viral podría ser secundaria en relación a la presencia de enfermedad sintomática, y quizás tampoco se encontrara relacionada con el genotipo de UL144. Para otros genotipos diferentes de B, las cargas virales en líquido amniótico no fueron predictivas de evolución, aunque el tamaño poblacional fue pequeño ³⁴. Waters et al describen que los genotipos UL144 A y UL144 C presentaban mayores cargas virales en plasma que UL144 B, reseñando que la mayoría de dichos pacientes desarrollaron manifestaciones clínicas.

El estudio para la identificación de un marcador viral de enfermedad por CMVh ha generado más debates que consensos, aunque diversas conclusiones concuerdan con nuestro trabajo, como es que la mayoría de los

genotipos se transmiten de madres a hijos, que en muchas de las infecciones congénitas se detecta una única cepa, o en la presentación de infecciones mixtas, aún no está clara la relevancia en la progresión de la enfermedad. No existe duda alguna de que las investigaciones deberían continuar incluyendo estudios prospectivos multicéntricos con poblaciones bien controladas y con la estandarización de la metodología para la clasificación de los genotipos y cepas.

5.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Es importante señalar que nuestro estudio tiene una serie de limitaciones. La limitación principal es que se trató de un estudio retrospectivo, con motivo de poder incluir un número algo aceptable de sujetos. No se incluyeron datos de todas las áreas geográficas de España, si no únicamente del área de Madrid, ya que no existe hasta la fecha un estudio que describa la distribución geográfica de los diferentes genotipos. Probablemente, nuestro estudio no refleje de forma exacta lo que pueda estar ocurriendo en todo el país. Sin embargo, a pesar de esta limitación, creemos que el incluir muestras de 11 años y de diferentes hospitales del área de Madrid, eliminaría cierto sesgo que se pudiera introducir debido a situaciones puntuales en cuanto a distribución geográfica, pudiendo extrapolar estos resultados al resto del país. También recalcar, que los últimos años del estudio, el número de muestras fue mayor a los años anteriores, debido a una mayor concienciación en el hospital y por tanto, estudios más completos de los pacientes. Además, la mayoría de nuestras muestras son de pacientes sintomáticos debido a la falta de cribaje universal, y hemos incluido los pacientes a partir de datos microbiológicos.

DISCUSIÓN

Al ser un número limitado de sujetos, la frecuencia de infecciones por determinados genotipos únicos o mixtas podría estar infraestimada no representando la verdadera diversidad viral, a pesar de que utilizamos como metodología PCR en tiempo real con sondas específicas para cada uno de los genotipos, con excepción de UL144 en el que llevamos a cabo PCR y análisis de las temperaturas de Melting. Nuevas tecnologías como la secuenciación masiva pueden ser útiles para la categorización de los diferentes subtipos y puede ayudar en la definición clara de las cepas.

Otra de las limitaciones del estudio fue que en la mayoría de los pacientes no teníamos muestras de diferentes compartimentos, y por tanto no pudimos observar si existía diferencia entre ellos, aunque en aquellos pacientes que si tenían, no encontramos diferentes genotipos. Además, no llevamos a cabo el seguimiento de los pacientes y por tanto, desconocemos si algunos de los pacientes que eran asintomáticos al nacimiento desarrollaron secuelas a largo plazo.

Otra limitación, es que únicamente hemos estudiado la presencia de algunos genes de virulencia y no en todos los que se ha encontrado variabilidad, pero no la expresión de los mismos durante el proceso de infección en diferentes líneas celulares, por tanto, no podemos conocer como se regulan y en qué modo participan en el proceso de infección.

El estudio presentado a pesar de sus limitaciones, aporta datos de interés que aumentan nuestro conocimiento sobre la epidemiología de las infecciones por CMVh en población pediátrica y en trasplantados en España. Se aportan datos sobre la distribución global de los diferentes genotipos de glicoproteína B, glicoproteína H y UL144 en estas poblaciones, desconocidos

DISCUSIÓN

hasta la fecha en nuestro país. Además, este estudio contribuye a tener un conocimiento más profundo sobre las características de las infecciones pediátricas por CMVh en función de la adquisición de las mismas, de la posible relación de los genotipos con la enfermedad así como la carga viral. En este aspecto, este estudio es un primer paso en el conocimiento de los diferentes genotipos de CMVh y su implicación en los distintos síndromes clínicos, aunque son necesarios estudios de expresión de genes que corroboren estos resultados.

VI.CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran una primera aproximación en el conocimiento acerca de la epidemiología molecular de *Citomegalovirus* humano en pacientes con infección congénita, infección adquirida y receptores de trasplante de órgano sólido en España. Aunque el carácter retrospectivo de nuestro estudio conllevó una serie de limitaciones, podemos concluir:

1. Todos los genotipos de glicoproteína B, glicoproteína H y UL144 pueden ser transmitidos de madre a hijo, y todos ellos son capaces de generar síntomas.
2. El presente estudio demuestra que existe una gran diversidad en las cepas de *Citomegalovirus* humano que pueden causar infección congénita como genotipo único, y que la infección por múltiples genotipos es más común en pacientes con infección adquirida y en receptores de trasplante de órgano sólido que en pacientes con infección congénita.
3. El genotipo 3 de glicoproteína B fue más habitual en infección congénita, mientras que el genotipo 1 de glicoproteína B fue el más frecuente en infección adquirida.
4. El genotipo 2 de glicoproteína B fue el genotipo más habitual en niños con infección congénita cuyas pruebas de imagen revelaban la presencia de quistes periventriculares, mientras que el genotipo 3 de glicoproteína B fue menos frecuente en aquellos pacientes con afectación motora.
5. En trasplante, el síndrome viral fue más frecuente en aquellos pacientes que presentaban genotipos 1 y 2 de glicoproteína B, y la infección por

CONCLUSIONES

CMVh aparecía de manera más temprana tras el trasplante en aquellos con genotipo 1, mientras que el genotipo 3 de glicoproteína B fue más frecuente en viremia asintomática y los pacientes presentaban menor carga viral.

6. El genotipo 1 de glicoproteína H fue el más habitual en todas las poblaciones estudiadas.
7. El genotipo 2 de glicoproteína H fue más frecuente en aquellos pacientes con afectación ocular.
8. En trasplante, los pacientes asignados al genotipo 2 de glicoproteína H presentaron con mayor frecuencia síndrome viral y mayor carga viral plasmática, mientras que los del genotipo 1 de glicoproteína H viremia asintomática y la infección por CMVh aparecía más tarde tras el trasplante.
9. UL144 B fue el genotipo más habitual en todas las poblaciones estudiadas. UL144A/C es un genotipo recombinante habitual en nuestro medio, a diferencia de UL144 A/B.
10. UL144 C fue más frecuente en gestantes de menor edad y primigestas y en receptores de trasplante con síndrome viral, mientras que UL144B en mujeres de mayor edad y cuyos fetos presentaban como hallazgo extrecerebral más habitual la esplenomegalia. UL144 A/C fue más frecuente en aquellos pacientes con hipoacusia unilateral.

VII.BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Weller TH, Macauley JC, Craig JM, Wirth P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957; 94(1):4–12.
2. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* 1995; 76 (Pt 4):741-50.
3. Murray PR, Baron JO, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Human cytomegalovirus. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. vol.2 p.1549- 1563. ASM Press Washington, D.C (ed.)
4. Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol* 2008; 197(2):65–73.
5. Dolan A, Cunningham C, Hector RD, Hassan-Walker AF, Lee L, Addison C, et al. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2004; 85(Pt5):1301-12.
6. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis* 2004; 4(12):725-38.
7. Gibson W. Structure and formation of the cytomegalovirus virion. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 325: 187-204.
8. Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stolc V, et al. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *PNAS* 2003; 100 (24):14223–28.
9. Wood LJ, Baxter MK, Plafker SM, Gibson W. Human cytomegalovirus capsid assembly protein precursor (pUL80.5) interacts with itself and with the major capsid protein (pUL86) through two different domains. *J Virol* 1997; 71(1): 179-90.
10. Gibson W. Assembly and maturation of the capsid. In, *Cytomegaloviruses: Molecular biology and Immunology*. Ed, M. Reddehase. Caister Academic Press. 2006; pp 231-44.
11. Muranyi W, Haas J, Wagner M, Krohne G, Koszinowski UH. Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science* 2002; 297(5582):854-7.

BIBLIOGRAFIA

12. Silva MC, Ya A-C, Enquist L, Shenk T. Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids. *J Virol* 2003; 77(19): 10594-605.
13. Gibson W. Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 1996; 39 (5-6):389-400.
14. Kaletja RF. Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72(2):249.
15. Varnum SM, Streblow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Pasa-Tolic L, et al. Identification proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* 2004; 78(20):10960-6.
16. Vanarsdall AL, Johnson DC. Human cytomegalovirus entry into cells. *Curr Opin Virol* 2012; 2(1):37-42.
17. Mocarski E, Shenk T and Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM and Howley PM (eds) *Fields Virology*, 5th edn, pp. 2701-72. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
18. Murphy E, Shenk T. Human Cytomegalovirus genome. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 325:1-19.
19. Sijmons S, Van Ranst M, Mans P. Genomic and Functional Characteristics of Human Cytomegalovirus Revealed by Next-generation Sequencing. *Viruses* 2014; 6 (3):1049-72.
20. Davison AJ, Dolan A, Aketer P, Addison C, Drajan DJ, Alcendor DJ, et al. The human cytomegalovirus revised: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* 2003; 84(Pt1): 17-28.
21. Murphy E, Rigoutsos I, Shibuya T, Shenk TE. Reevaluation of Human Cytomegalovirus coding potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 (23):13585-90.
22. Gatherer D, Seirafian S, Cunningham C, Holton M, Dargan DJ, Baluchova K, et al. High-resolution human cytomegalovirus transcriptome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(49): 19755-60.
23. Stern-Ginnosar N, Weisburd B, Michalski A, Le VT, Hein MY, Huang SX et al. Decoding human cytomegalovirus. *Science* 2012; 338 (6110):1088-93.

BIBLIOGRAFIA

24. Prichard MN, Penfold ME, Duke GM, Spaete RR, Kemble GW. A review of genetic differences between limited and extensively passaged human cytomegalovirus strains. *et al. Rev Med Virol* 2001; 11(3): 191-200.
25. Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 1996; 70(1): 78-83.
26. Akter P, Cunningham C, McSharry BP, Dolan A, Addison C, Dargan DJ, et al. Two novel spliced genes in human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2003; 84(Pt5):1117-22.
27. Yu D, Smith GA, Enquist LW, Shenk T. Construction of a self-excisable bacterial artificial chromosome containing the human cytomegalovirus genome and mutagenesis of the diploid TRL/IRL 13 gene. *J Virol.* 2002;76(5):2316-28.
28. Dargan DJ, Jamieson FE, MacLean J, Dolan A, Addison C, McGeoch DJ. The published DNA sequence of human cytomegalovirus strain AD169 lacks 929 base pairs affecting genes UL42 and UL43. *J Virol* 1997; 71(12):9833-6.
29. Mocarski ES, Prichard MN, Tan CS, Brown JM. Reassessing the organization of the UL42-UL43 region of the human cytomegalovirus strain AD169 genome. *Virology* 1997; 239 (1): 169-75.
30. Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarski ES, Goldmacher VS. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(14):7829-34.
31. Hahn G, Revello MG, Patrone M, Percivalle E, Campanini G, Sarasini A, et al. Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J Virol* 2004; 78(18):10023-33.
32. Gerna G, Percivalle E, Lilleri D, Lozza L, Fornara C, Hahn F et al. Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-UL128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells. *J Gen Virol* 2005; 86 (Pt2):275-84.
33. Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* 2007; 17(5):355-63.

BIBLIOGRAFIA

34. Arav-Boger R , Battaglia CA, Lazzarotto T, Gabrielli L, Zong JC, Hayward GS et al. Cytomegalovirus (CMV)-encoded UL144 (truncated tumor necrosis factor receptor) and outcome of congenital CMV infection. *J Infect Dis* 2006; 194(4):464-73.
35. Boppana SB, Fowler KB, Pass RF, Rivera LB, Bradford RB, Lakeman FD, et al. Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J Pediatr* 2005; 146(6):817-23.
36. Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, Papa I, Gabrielli L, Guerra B et al. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics* 2006; 117(1): e76-83.
37. Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M et al. Genetic variations in the gB, UL144 and UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected Japanese children. *Arch Virol* 2008; 153(4):667–74.
38. Sekulin K, Görzer I, Heiss-Czedik D, Puchhammer-Stöckl E. Analysis of the variability of CMV strains in the RL11D domain of the RL11 multigene family. *Virus Genes* 2007; 35(3):577-83.
39. Hayajneh WA, Colberg-Poley AM, Skaletskaya A, Bartle LM, Lesperance MM, Contopoulos-Ioannidis DG et al. The sequence and antiapoptotic functional domains of the human cytomegalovirus UL37 exon 1 immediate early protein are conserved in multiple primary strains. *Virology* 2001; 279(1): 233-40.
40. Chou SW, Dennison KM. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization related epitopes. *J Infect Dis* 1991; 163(6):1229–34.
41. Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, Landini MP. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wildtype strains. *Rev Med Virol* 2004; 14(6):383–410.
42. Mattick C, Dewin D, Polley S, Sevilla-Reyes E, Pignatelli S, Rawlinson W, et al. Linkage of human cytomegalovirus glycoprotein gO variant groups identified from worldwide clinical isolates with gN genotypes, implications for disease associations and evidence for N-terminal sites of positive selection. *Virology* 2004; 318(2):582–97.
43. Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, Lazzarotto T, Gatto MR, Landini MP. Intrauterine cytomegalovirus infection and glycoprotein N (gN) genotypes. *J Clin Virol* 2003; 28(1):38–43.
44. Stanton R, Westmoreland D, Fox JD, Davison AJ, Wilkinson GW. Stability of human cytomegalovirus genotypes in persistently infected renal transplant recipients. *J Med Virol* 2005; 75(1):42–6.

45. Rasmussen L, Geissler A, Winters M. Inter- and intragenic variations complicate the molecular epidemiology of human cytomegalovirus. *J Infect Dis* 2003; 187(5):809–19.
46. Brytting M, Wahlberg J, Lundeberg J, Wahren B, Uhlén M, Sundqvist VA. Variations in the cytomegalovirus major immediate-early gene found by direct genomic sequencing. *J Clin Microbiol* 1992; 30(4):955-60.
47. Mousavi-Jazi M et al. Sundqvist VA, Linde A, Wahren B, Brytting M. Growth phenotypes of cytomegalovirus isolates do not correlate with glycoprotein B, major immediate early genotypes or antiviral sensitivity. *J Med Virol* 2000; 62(2):117-26.
48. Qi Y, Mao ZQ, Ruan Q, He R, Ma YP, Sun ZR, et al. Human cytomegalovirus (HCMV) UL139 open Reading frame:sequence variant are clustered into three major genotypes. *J Med Virol* 2006; 78(4):517-22.
49. Arav-Boger R, Willoughby RE, Pass RF, Zong JC, Jang WJ, Alcendor D, et al. Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis factor-alpha and beta-chemokine receptors in congenital CMV disease. *J Infect Dis* 2002; 186(8):1057–64.
50. Bale JF Jr, Petheram SJ, Robertson M, Murph JR, Demmler G. Human cytomegalovirus a sequence and UL144 variability in strains from infected children. *J Med Virol* 2001; 65(1):90–6.
51. Lurain NS, Kapell KS, Huang DD, Short JA, Paintsil J, Winkfield E, Benedict CA, Ware CF, Bremer JW. Human cytomegalovirus UL144 open reading frame: sequence hypervariability in low-passage clinical isolates. *J Virol* 1999; 73(12):10040–50.
52. Picone O, Costa JM, Chaix ML, Ville Y, Rouzioux C, Leruez-Ville M. Human cytomegalovirus UL144 gene polymorphisms in congenital infections. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1):25–9.
53. Arav-Boger R, Zong JC, Foster CB. Loss of linkage disequilibrium and accelerated protein divergence in duplicated cytomegalovirus chemokine genes. *Virus Genes* 2005; 31(1):65-72.
54. Lurain N, Fox A, Lichy H, Bhorade S, Ware C, Huang D, et al. Analysis of the human cytomegalovirus genomic region from UL146 through UL147A reveals sequence hypervariability, genotypic stability, and overlapping transcripts. *Virol J* 2006; 3:4.

BIBLIOGRAFIA

55. He R, Ruan Q, Qi Y, Ma YP, Huang YJ, Sun ZR et al. Sequence variability of human cytomegalovirus UL146 and UL147 genes in low-passage clinical isolates. *Intervirology* 2006; 49(4):215-23.
56. Davis CL, Field D, Metzgar D, Saiz R, Morin PA, Smith IL, et al. Numerous length polymorphisms at short tandem repeats in human cytomegalovirus. *J Virol* 1999; 73(8): 6265-70.
57. Walker A, Petheram SJ, Ballard L, Murph JR, Demmler GJ, Bale JF Jr. Characterization of human cytomegalovirus strains by analysis of short tandem repeat polymorphisms. *J Clin Microbiol* 2001; 39(6):2219-26.
58. Wang X, Huong SM, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang ES. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* 2003; 424 (6947): 456-61.
59. Soroceanu L, Akhavan A, Cobbs CS. Platelet-derived growth factor- α receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature* 2008; 455(7211):391–5.
60. Feire AL, Roy RM, Manley K, Compton T. The glycoprotein B disintegrin-like domain binds β 1 integrin to mediate cytomegalovirus entry. *J Virol* 2010; 84(19):10026–37.
61. Steven AC, Spear PG. Biochemistry. Viral glycoproteins and an evolutionary conundrum. *Science* 2006; 313(5784): 177-8.
62. Britt WJ, Mach M. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* 1996; 39(5-6): 401-12.
63. Sharma S, Wisner TW, Johnson DC, Heldwein EE. HCMV gB shares structural and functional properties with gB proteins from other herpesviruses. *Virology* 2013; 435(2):239-49.
64. Spaete RR, Thayer RM, Probert WS, Masiarz FR, Chamberlain SH, Rasmussen L, et al. Human cytomegalovirus strain Towne glycoprotein B is processed by proteolytic cleavage. *Virology* 1988; 167(1):207-25.
65. Trincado DE, Scott GM, White PA, Hunt C, Rasmussen L, Rawlinson WD. Human cytomegalovirus strains associated with congenital and perinatal infections. *J Med Virol* 2000; 61(4):481-7.

BIBLIOGRAFIA

66. Zipeto D, Hong C, Gerna G, Zavattoni M, Katzenstein D, Merigan TC et al. Geographic and demographic differences in the frequency of human cytomegalovirus gB genotypes 1-4 in immunocompromised patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14(6):533-6.
67. Aquino VH, Figueiredo LT. High prevalence of renal transplant recipients infected with more than one cytomegalovirus glycoprotein B genotype. *J Med Virol* 2000; 61(1):138-42.
68. Manuel O, Asberg A, Pang X, Rollag H, Emery VC, Preiksaitis JK, et al. Impact of genetic polymorphisms in cytomegalovirus glycoprotein B on outcomes in solid-organ transplant recipients with cytomegalovirus disease. *Clin Infect Dis* 2009; 49(8):1160-6.
69. Fries BC, Chou S, Boeckh M., Torok-Storb B.. Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* 1994; 169(4):769–74.
70. Xia CS, Zhao XT, Sun YY, Zhang Z. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Chinese hematopoietic stem cell transplant recipients. *Intervirology* 2012; 55(5):342-8.
71. Manuel O, Pang X, Humar A, Kumar D, Doucette K, Preiksaitis JK. An assessment of donor-to-recipient transmission patterns of human cytomegalovirus by analysis of viral genomic variants. *J Infect Dis* 2009; 199(11):1621-8.
72. Madi N, Al-Nakib W, Pacsa A, Saeed T. Cytomegalovirus genotypes gB1 and gH1 are the most predominant genotypes among renal transplant recipients in Kuwait. *Transplant Proc* 2011; 43(5):1634-7.
73. Bale JF Jr, Petheram SJ, Souza IE, Murph JR. Cytomegalovirus reinfection in young children. *J Pediatr* 1996; 128(3):347-52.
74. Lukácsi A, Taródi B, Endreffy E, Bábinszki A, Pál A, Pusztai R. Human cytomegalovirus gB genotype 1 is dominant in congenital infections in South Hungary. *J Med Virol* 2001; 65(3):537-42.
75. Jin H, Wang X, Li S. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotype correlates with different symptoms of infected infants. *Intervirology* 2007; 50(3):219-23.

76. Barbi M, Brinda S, Caroppo S, Primache V, Didó P, Guidotti P, et al. CMV gB genotypes and outcome of vertical transmission: study on dried blood spots of congenitally infected babies. *J Clin Virol* 2001; 21(1):75-9.
77. You ZS, Zou CC, Zhen JY, Zhao ZY. Cytomegalovirus gB genotypes and clinical features in Chinese infants with congenital infections. *Intervirology* 2006; 49(5):281-5.
78. Gandhoke I, Hussain SA, Pasha ST, Chauhan LS, Khare S. Glycoprotein B genotyping in congenital/perinatal cytomegalovirus infection in symptomatic infants. *Indian Pediatr* 2013; 50(7): 663-7.
79. Arellano-Galindo J, Villanueva-García D, Cruz-Ramirez JL, Yalaupari-Mejía JP, Uribe-Gutiérrez G, Velázquez-Guadarrama N et al. Detection and gB genotyping of CMV in Mexican preterm infants in the context of maternal seropositivity. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8(6): 758-67.
80. Rycel M, Wujcicka W, Zawilinska B, Paradowska E, Suski P, Gaj Z, et al. Mixed infections with distinct cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Polish pregnant women, fetuses, and newborns. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34(3):585-91.
81. Nijman J, Mandemaker FS, Verboon-Macielek MA, Aitken SC, van Loon AM, de Vries LS, et al. Genotype distribution, viral load and clinical characteristics of infants with postnatal or congenital cytomegalovirus infection. *PLoS One* 2014; 9(9): e108018.
82. Pati SK, Pinninti S, Novak Z, Chowdhury N, Patro RK, Fowler K, et al. Genotypic diversity and mixed infection in newborn disease and hearing loss in congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2013; 32(10): 1050-4.
83. Kaye JF, Gompels UA, Minson AC. Glycoprotein H of human cytomegalovirus (HCMV) forms a stable complex with the HCMV UL115 gene product. *J Gen Virol* 1992; 73(Pt 10): 2693-8.
84. Huber MT, Compton T. Intracellular formation and processing of the heterotrimeric gH-gL-gO (gCIII) glycoprotein envelope complex of human cytomegalovirus. *J Virol* 1999; 73(5):3886–92.
85. Ryckman BJ, Chase MC, Johnson DC. Human cytomegalovirus TR strain glycoprotein O acts as a chaperone promoting gH/gL incorporation into virions but is not present in virions. *J Virol* 2010; 84(5):2597-609.

BIBLIOGRAFIA

86. Wille PT, Knoche AJ, Nelson JA, Jarvis MA, Johnson DC. A human cytomegalovirus gO-null mutants fails to incorporate gH/gL into the virion envelope and is unable to enter fibroblasts and epithelial and endothelial cells. *J Virol* 2010; 84(5):2585-96.
87. Wang D, Shenk T. Human cytomegalovirus UL131 open reading frame is required for epithelial cell tropism. *J Virol* 2005; 79(16):10330–8.
88. Chou S. Molecular epidemiology of envelope glycoprotein H of human cytomegalovirus. *J Infect Dis* 1992; 166(3):604-7.
89. Zhou L, Fan J, Zheng SS, Ma WH. Genetic variation within the glycoprotein B and H genes of human cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2007; 9(1):73-7.
90. Qian HL, Cai T, Jin HM. Human cytomegalovirus glycoprotein genotypes in the genital tract tissue of tubal pregnancy patients. *J Int Med Res* 2009; 37(2): 385-91.
91. Ishibashi K, Tokumoto T, Tanabe K, Shirakawa H, Hashimoto K, Kushida N et al. Association of the outcome of renal transplantation with antibody response to cytomegalovirus strain-specific glycoprotein H epitopes. *Clin Infect Dis* 2007;45(1):60-7.
92. Paradowska E, Jablonska A, Studzinska M, Kasztelewicz B, Zawilinska B, Wisniewska-Ligier M et al. Cytomegalovirus glycoprotein H genotype distribution and the relationship with hearing loss in children. *J Med Virol* 2014; 86(8):1421-7.
93. Benedict GA, Butrovich KD, Lurain NS, Corbeil J, Rooney I, Schneider P et al . Cutting edge: a novel viral TNF receptor superfamily member in virulent strains of human cytomegalovirus. *J Immunol* 1999; 162(12): 6967-70.
94. Pignatelli S, Lazzarotto T, Gatto MR, Dal Monte P, Landini MP, Faldella G et al. Cytomegalovirus gN genotypes distribution among congenitally infected newborns and their relationship with symptoms at birth and sequelae. *Clin Infect. Dis* 2010; 51(1): 33–41.
95. Paradowska E, Jablonska A, Studzinska M, Suski P, Kasztelewicz B, Zawilinska B et al. Distribution of cytomegalovirus gN variants and associated sequelae in infants. *J Clin Virol* 2013; 58(1):271-5.

BIBLIOGRAFIA

96. Lisboa LF, Tong Y, Kumar D, Pang XL, Asberg A, Hartmann A et al. Analysis and clinical correlation of genetic variation in cytomegalovirus. *Transplant Infect Dis* 2012; 14(2): 132-40.
97. Heo J, Petheramb S, Demmler G, Murph JR, Adler SP, James Bale J et al. Polymorphisms within human cytomegalovirus chemokine (UL146/UL147) and cytokine receptor genes (UL144) are not predictive of sequelae in congenitally infected children. *Virology* 2008; 378 (1):86-96.
98. Paradowska E, Jablonska A, Plociennikowska A, Studzinska M, Suski P, Wisniewska-Ligier M et al. Cytomegalovirus alpha-chemokine genotypes are associated with clinical manifestations in children with congenital or postnatal infections. *Virology* 2014; 462-463: 208-17.
99. Ji YH, Ruan Q, Sun ZR, Ma YP, He R, Qi Y et al. Structure and variability of the UL149 open reading frame from low-passage clinical isolates of human cytomegalovirus. *J Virol Methods* 2006; 131(1):72-7.
100. Paradowska E, Studzinska M, Nowakowska D, Wilczynski J, Rycel M, Suski P et al. Distribution of UL144, US28 and UL55 genotypes in Polish newborns with congenital cytomegalovirus infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(7):1335-45.
101. Brune W. Inhibition of programmed cell death by cytomegaloviruses *Virus Res* 2011; 157(2):144-50.
102. Jean Beltran PM, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons for proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2014; 11(6):697-711.
103. Mocarski ES Jr. Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell Microbiol* 2004; 6(8): 707-17.
104. Griffiths PD. Burden of disease associated with human cytomegalovirus and prospects for elimination by universal immunisation. *Lancet Infect Dis* 2012; 12(10): 790-8.
105. Söderberg-Nauclér C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogenic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 1997; 91(1):119-26.

BIBLIOGRAFIA

106. Sinzger C, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 325: 63-83.
107. Iversen AC, Norris PS, Ware CF, Benedict CA. Human NK cells inhibit cytomegalovirus replication through a noncytolytic mechanism involving lymphotoxin-dependent induction of IFN-beta. *J Immunol* 2005; 175(11):7568-74.
108. Gillespie GM, Wills MR, Appay V, O'Callaghan C, Murphy M, Smith N et al. Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol* 2000; 74(17):8140-50.
109. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 2005; 202(5):673-85.
110. Chen SF, Tu WW, Sharp MA, Tongson EC, He XS, Greenberg HB et al. Antiviral CD8 T cells in the control of primary human cytomegalovirus infection in early childhood. *J Infect Dis* 2004; 189(9):1619-27.
111. Tu W, Chen S, Sharp M, Dekker C, Manganello AM, Tongson EC, Maecker HT et al. Persistent and selective deficiency of CD4+ T cell immunity to cytomegalovirus in immunocompetent young children. *J Immunol* 2004; 172(5):3260-7.
112. Day EK, Carmichael AJ, ten Berge IJ, Waller EC, Sissons JG, Wills MR. Rapid CD8+ T cell repertoire focusing and selection of high-affinity clones into memory following primary infection with a persistent human virus: human cytomegalovirus. *J Immunol* 2007; 179(5):3203-13.
113. Elkington R, Walker S, Crough T, Menzies M, Tellam J, Bharadwaj M, et al. Ex vivo profiling of CD8+-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol* 2003; 77(9):5226-40.
114. Gkrania-Klotsas E, Langenberg C, Sharp SJ, Luben R, Khaw KT, Wareham NJ. Seropositivity and higher immunoglobulin g antibody levels against cytomegalovirus are associated with mortality in the population-based European prospective investigation of Cancer-Norfolk. *Clin Infect Dis* 2013; 56(10):1421-7.

BIBLIOGRAFIA

115. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol* 2010; 20(4): 202-13.
116. de Ory F, Ramírez R, García Comas L, León P, Sagües MJ, Sanz JC. Is there a change in cytomegalovirus seroepidemiology in Spain? *Eur J Epidemiol* 2004; 19(1):85-9.
117. Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin Infect Dis* 2010; 50(11):1439-47.
118. Clarke LM, Duerr A, Feldman J, Sierra MF, Daidone BJ, Landesman SH. Factors associated with cytomegalovirus infection among human immunodeficiency virus type 1-seronegative and –seropositive women from an urban minority community. *J Infect Dis* 1996; 173(1):77-82.
119. Lazzarotto T, Guerra B, Gabrielli L, Lanari M, Landini MP. Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(9):1285-93.
120. Gabrielli L, Bonasoni MP, Lazzarotto T, Lega S, Santini D, Foschini MP et al. Histological findings in fetuses congenitally infected by cytomegalovirus. *J Clin Virol* 2009; 46 (Suppl 4):S16-S21.
121. Kenneson A, Cannon MJ. Review and metanalysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 2007; 17(4):253-76.
122. Hyde TB, Schmid DS, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroconversion rates and risk factors: implications for congenital CMV. *Rev Med Virol* 2010; 20(5): 311-26.
123. Kourí V, Correa CB, Verdasquera D, Martínez PA, Alvarez A, Alemán Y et al. Diagnosis and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women in Cuba as prognostic markers of congenital infection in newborns: 2007-2008. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29(12): 1105-10.
124. Akinbami AA, Rabiou KA, Adewunmi AA, Wright KO, Dosunmu AO, Adeyemo TA et al. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies amongst normal pregnant women in Nigeria. *Int J Womens Health* 2011; 3: 423-8.
125. Pass RF, Anderson B. Mother to Child transmission of cytomegalovirus and prevention of congenital infection. *J Ped Infect Dis Soc* 2014; 3(Suppl 1): S2-S6.
126. Manicklal S, Every VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK .The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26(1):86-102.

BIBLIOGRAFIA

127. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(4): 680-715.
128. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, do Carmo Rego MA, Pinto C, da Motta MS et al. Perinatal or early posnatal cytomegalovirus infection in preterm infants under 34 weeks gestation born to CMV seropositive mothers within a higher seroprevalence population. *J Pediatr* 2004; 145(5): 685- 8.
129. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* 2001; 344(18):1366 –71.
130. Pass F, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Stagno S. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *J Clin Virol* 2006; 35(2): 216-20.
131. Boppana S, Pass RF, Britt WJ, Stagno S, Alford CA. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11(2):93-9.
132. Anderson KS, Amos CS, Boppana S, Pass R. Ocular abnormalities in congenital cytomegalovirus infection. *J Am Optom Assoc* 1996; 67(5):273-78.
133. Coats DK, Demmler GJ, Paysse EA, Du LT, Libby C. Ophthalmologic findings in children with congenital cytomegalovirus infection. *J AAPOS* 2000; 4(2): 110-6.
134. Cannon MJ. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J Clin Virol* 2009; 46(Suppl 4): S6-S10.
135. Baquero-Artigao F, Grupo de estudio de la infección congénita por Citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. Documento de consenso de la Sociedad Española de la Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por CMV. *An Pediatr (Barc)* 2009; 71(6): 535-47.
136. Dable AJ, Fowler KB, Wright JD, Boppana SB, Britt WJ, Pass RF. Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus. *J Am Acad Audiol* 2000; 11(5): 283-90.
137. Mania A, Kemnitz P, Mazur-Melewska K, Figlerowicz M, Cudnoch K, Sluzewski W, Kowala-Piaskowska A, Mozer-Lisewska I. Human cytomegalovirus infection and clinical status of infants born to human immunodeficiency virus type 1 infected mothers. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25(2):180–6.
138. Doyle M, Atkins JT, Rivera-Matos IR. Congenital cytomegalovirus infection in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15(12):1102–6.

139. Alarcón Allen A, Baquero-Artigao F, Grupo de estudio de la infección congénita por Citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. Revisión y recomendaciones sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección posnatal por citomegalovirus. *An Pediatr (Barc)* 2011; 74(1): 52.e1-e52.e13.
140. Stagno S, Reynolds DW, Pass RF, Alford CA. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 1980; 302(19):1073-6.
141. Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M, Dietz K, Speer CP, Jahn G. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet* 2001; 357(9255): 513-8.
142. Jim WT, Shu CH, Chiu NC, Chang JH, Hung HY, Peng CC et al. High cytomegalovirus load and prolonged virus excretion in breast milk increase risk for viral acquisition by very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28(10): 891-4.
143. Pass RF, Little EA, Stagno S, Britt WJ, Alford CA. Young children as a probable source of maternal and congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 1987; 316(22):1366-70.
144. Adler SP. Molecular epidemiology of cytomegalovirus: viral transmission among children attending a day care center, their parents, and caretakers. *J Pediatr* 1988; 112(3):366-72.
145. Blackman JA, Murph JR, Bale JF Jr. Risk of cytomegalovirus infection among educators and health care personnel serving disabled children. *Pediatr Infect Dis* 1987; 6(8):725-9.
146. Hutto C, Little EA, Ricks R, Lee JD, Pass RF. Isolation of cytomegalovirus from toys and hands in a day care center. *J Infect Dis* 1986; 154(3):527-30.
147. Stowell JD, Forlin-Passoni D, Din E, Radford K, Brown D, White A, et al. Cytomegalovirus survival on common environmental surfaces: opportunities for viral transmission. *J Infect Dis* 2012; 205(2):211-4.
148. Adler SP, Baggett J, Wilson M, Lawrence L, McVoy M. Molecular epidemiology of cytomegalovirus in a nursery: lack of evidence for nosocomial transmission. *J Pediatr* 1986; 108(1): 117-23.
149. Sia IG, Patel R. New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(1): 83-121.
150. Humar A, Snyderman D; AST Infectious Diseases Community of Practice. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9(Suppl 4): S78-S86.

BIBLIOGRAFIA

151. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 2007; 357(25): 2601-14.
152. Razonable RR, Hayden RT. Clinical utility viral load of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26(4): 703-27.
153. Preiksaitis JK, Brown L, McKenzie M. The risk of cytomegalovirus infection in seronegative transfusion recipients not receiving exogenous immunosuppression. *J Infect Dis* 1988; 157(3):523-9.
154. Roback JD. CMV and blood transfusions. *Rev Med Virol* 2002; 12(4):211-9.
155. Lamb SG, Stern H. Cytomegalovirus mononucleosis with jaundice as presenting sign. *Lancet* 1966; 2(7471):1003-6.
156. Chretien JH, McGinniss CG, Muller A. Venereal causes of cytomegalovirus mononucleosis. *JAMA* 1977; 238(15):1644-5.
157. Handsfield HH, Chandler SH, Caine VA, Meyers JD, Corey L, Medeiros E et al. Cytomegalovirus infection in sex partners: evidence for sexual transmission. *J Infect Dis* 1985; 151(2):344-8.
158. Coutinho RA, Wertheim-van Dillen P, Albrecht-van Lent P, Nagelkerke N, Kuipers H, van Bentum-van Haagen A et al. Infection with cytomegalovirus in homosexual men. *Br J Vener Dis* 1984; 60(4):249-52.
159. Collier AC, Meyers JD, Corey L, Murphy VL, Roberts PL, Handsfield HH. Cytomegalovirus infection in homosexual men. Relationship to sexual practices, antibody to human immunodeficiency virus, and cell-mediated immunity. *Am J Med* 1987; 82(3 Spec No):593-601.
160. Mintz L, Drew WL, Miner RC, Braff EH. Cytomegalovirus infections in homosexual men. An epidemiological study. *Ann Intern Med* 1983; 99(3):326-9.
161. Pérez-Sáenz JL. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Citomegalovirus. Editorial Panamericana-Buenos Aires 2006; p747-57.
162. Eddleston M, Peacock S, Juniper M, Warrell DA. Severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis* 1997; 24(1):52-6.
163. Siegal DS, Hamid N, Cunha BA. Cytomegalovirus colitis mimicking ischemic colitis in an immunocompetent host. *Heart Lung* 2005; 34(4):291-4.
164. Seo TH, Kim JH, Ko SY, Hong SN, Lee SY, Sung IK et al. Cytomegalovirus colitis in immunocompetent patients: a clinical and endoscopic study. *Hepatogastroenterology* 2012; 59(119):2137-41.

BIBLIOGRAFIA

165. Villar LA, Massanari RM, Mitros FA. Cytomegalovirus infection with acute erosive esophagitis. *Am J Med* 1984; 76(5):924-8.
166. Himoto T1, Goda F, Okuyama H, Kono T, Yamagami A, Inukai M et al. Cytomegalovirus-associated acute gastric mucosal lesion in an immunocompetent host. *Intern Med* 2009; 48(17):1521-4.
167. Lalazar G, Doviner V, Ben-Chetrit E. Clinical problem-solving. Unfolding the diagnosis. *N Engl J Med* 2014; 370(14):1344-8.
168. Taniwaki S, Kataoka M, Tanaka H, Mizuno Y, Hirose M. Multiple ulcers of the ileum due to Cytomegalovirus infection in a patient who showed no evidence of an immunocompromised state. *J Gastroenterol*; 32(4):548-52.
169. Dinesh BV, Selvaraju K, Kumar S, Thota S. Cytomegalovirus-induced colonic stricture presenting as acute intestinal obstruction in an immunocompetent adult. *BMJ Case Rep* 2013; pii: bcr-2013-200944.
170. Squizzato A, Ageno W, Cattaneo A, Brumana N. A case report and literature review of portal vein thrombosis associated with cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis* 2007; 44(2):e13-6.
171. Clarke J, Craig RM, Saffro R, Murphy P, Yokoo H. Cytomegalovirus granulomatous hepatitis. *Am J Med* 1979; 66(2):264-9.
172. Orlikowski D, Porcher R, Sivadon-Tardy V, Quincampoix JC, Raphaël JC, Durand MC et al. Guillain-Barré syndrome following primary cytomegalovirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2011; 52(7):837-44.
173. Lurain NS, Hanson BA, Martinson J, Leurgans SE, Landay AL, Bennett DA et al. Virological and immunological characteristics of human cytomegalovirus infection associated with Alzheimer disease. *J Infect Dis* 2013; 208(4):564-72.
174. Grilli E, Galati V, Bordi L, Taglietti F, Petrosillo N. Cytomegalovirus pneumonia in immunocompetent host: case report and literature review. *J Clin Virol* 2012; 55(4):356-9.
175. Kytö V, Vuorinen T, Saukko P, Lautenschlager I, Lignitz E, Saraste A et al. Cytomegalovirus infection of the heart is common in patients with fatal myocarditis. *Clin Infect Dis* 2005; 40(5):683-8.
176. High KP. Atherosclerosis and infection due to *Chlamydia pneumoniae* or cytomegalovirus: weighing the evidence. *Clin Infect Dis* 1999; 28(4):746-9.
177. Abgueguen P, Delbos V, Chennebault JM, Payan C, Pichard E. Vascular thrombosis and acute cytomegalovirus infection in immunocompetent patients: report of 2 cases and literature review. *Clin Infect Dis* 2003; 36(11):E134-9.

BIBLIOGRAFIA

178. Chee SP, Bacsal K, Jap A, Se-Thoe SY, Cheng CL, Tan BH. Clinical features of cytomegalovirus anterior uveitis in immunocompetent patients. *Am J Ophthalmol* 2008; 145(5):834-40.
179. Picone O, Vauloup-Fellous C, Cordier AG, Guitton S, Senat MV, Fuchs F et al. A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome. *Prenat Diagn* 2013; 33(8):751-8.
180. Nigro G, Anceschi MM, Cosmi EV; Congenital Cytomegalic Disease Collaborating Group. Clinical manifestations and abnormal laboratory findings in pregnant women with primary cytomegalovirus infection. *BJOG* 2003; 110(6):572-7.
181. Maschmann J, Hamprecht K, Dietz K, Jahn G, Speer CP. Cytomegalovirus infection of extremely low-birth weight infants via breast milk. *Clin Infect Dis* 200133(12):1998-2003.
182. Neuberger P, Hamprecht K, Vochem M, Maschmann J, Speer CP, Jahn G et al. Case-control study of symptoms and neonatal outcome of human milk-transmitted cytomegalovirus infection in premature infants. *J Pediatr* 2006; 148(3):326-31.
183. Townsend CL, Forsgren M, Ahlfors K, Ivarsson SA, Tookey PA, Peckham CS. Long-term outcomes of congenital cytomegalovirus infection in Sweden and the United Kingdom. *Clin Infect Dis* 2013; 56(9):1232-9.
184. Ross SA, Fowler KB, Ashrith G, Stagno S, Britt WJ, Pass RF et al. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J Pediatr* 2006; 148(3):332-6.
185. Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, Papa I, Gabrielli L, Guerra B et al. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics* 2006; 117(1):e76-83.
186. Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(1):99-126.
187. Noyola DE, Demmler GJ, Williamson WD, Griesser C, Sellers S, Llorente A et al. Cytomegalovirus urinary excretion and long term outcome in children with congenital cytomegalovirus infection. Congenital CMV Longitudinal Study Group. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(6):505-10.
188. Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S, Alford CA. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11(2):93-9.
189. Goderis J, De Leenheer E, Smets K, Van Hoecke H, Keymeulen A, Dhooze I. Hearing loss and congenital CMV infection: a systematic review. *Pediatrics* 2014; 134(5):972-82.

BIBLIOGRAFIA

190. Pass RF. Congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *Herpes* 2005; 12(2):50-5.
191. Dahle AJ, Fowler KB, Wright JD, Boppana SB, Britt WJ, Pass RF. Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus. *J Am Acad Audiol* 2000; 11(5): 283-90.
192. Fowler KB, Dahle AJ, Boppana SB, Pass RF. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? *J Pediatr* 1999; 135(1):60-4.
193. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Isaac Mde L, Amaral FR, Carneiro CG, Aragon DC et al. Congenital cytomegalovirus infection as a cause of sensorineural hearing loss in a highly immune population. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30(12):1043-6.
194. Strauss M. Human cytomegalovirus labyrinthitis. *Am J Otolaryngol* 1990; 11(5): 292-8.
195. Davis LE, Johnsson LG, Kornfeld M. Cytomegalovirus labyrinthitis in an infant: morphological, virological, and immunofluorescent studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 1981; 40(1):9-19.
196. Kyalat RI, Kelly EN, Ford-Jones EL. Clinical findings and adverse outcome in neonates with symptomatic congenital cytomegalovirus (SCCMV) infection. *Eur J Pediatr* 2006; 165(11):773-8.
197. Malm G, Engman ML. Congenital cytomegalovirus infections. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12(3):154-9.
198. Razonable RR, Humar A; AST Infectious Diseases Community of Practice. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013;13 Suppl 4:93-106.
199. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013; 96(4):333-60.
200. Razonable RR, Paya CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3):746-52.
201. Paya CV, Holley KE, Wiesner RH, Balasubramaniam K, Smith TF, Espy MJ et al. Early diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in liver transplant recipients: role of immunostaining, DNA hybridization and culture of hepatic tissue. *Hepatology* 1990; 12(1):119-26.
202. Mattes FM, McLaughlin JE, Emery VC, Clark DA, Griffiths PD. Histopathological detection of owl's eye inclusions is still specific for

BIBLIOGRAFIA

cytomegalovirus in the era of human herpesviruses 6 and 7. *J Clin Pathol* 2000; 53(8):612-4.

203. Chou S. Newer methods for diagnosis of cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 1990; 12 (Suppl 7):S727-36.

204. Cahill AG, Odibo AO, Stamilio DM, Macones GA. Screening and treating for primary cytomegalovirus infection in pregnancy: where do we stand? A decision-analytic and economic analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201(5):466.e1-7.

205. Walker SP, Palma-Dias R, Wood EM, Shekleton P, Giles ML. Cytomegalovirus in pregnancy: to screen or not to screen. *BMC Pregnancy Childbirth* 2013; 13:96.

206. Lazzarotto T. The best practices for screening, monitoring, and diagnosis of cytomegalovirus disease, Part II. *Clin Microbiol Newsletter* 2010; 32(2): 9-15.

207. Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2008; 41(3):192-7.

208. Soper DE. Congenital cytomegalovirus infection: an obstetrician's point of view. *Clin Infect Dis* 2013; 57 (Suppl 4):S171-3.

209. Lazzarotto T1, Varani S, Spezzacatena P, Gabrielli L, Pradelli P, Guerra B et al. Maternal IgG avidity and IgM detected by blot as diagnostic tools to identify pregnant women at risk of transmitting cytomegalovirus. *Viral Immunol*. 2000; 13(1):137-41.

210. Prince HE, Lapé-Nixon M. Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy. *Clin Vaccine Immunol* 2014; 21(10):1377-84.

211. Leruez-Ville M, Sellier Y, Salomon LJ, Stirnemann JJ, Jacquemard F, Ville Y. Prediction of fetal infection in cases with cytomegalovirus immunoglobulin M in the first trimester of pregnancy: a retrospective cohort. *Clin Infect Dis* 2013; 56(10):1428-35.

212. Humar A, Mazzulli T, Moussa G, Razonable RR, Paya CV, Pescovitz MD et al. Clinical utility of cytomegalovirus (CMV) serology testing in high-risk CMV D+/R- transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5(5):1065-70.

213. Giulieri S, Manuel O. QuantiFERON®-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert Rev Mol Diagn* 2011; 11(1):17-25.
214. Wreghitt TG, Teare EL, Sule O, Devi R, Rice P. Cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis* 2003; 37(12):1603-6.
215. Hughes JH. Physical and chemical methods for enhancing rapid detection of viruses and other agents. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6(2):150-75.
216. Razonable RR, Paya CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3):746-52.
217. Bek B, Boeckh M, Lepenies J, Bieniek B, Arasteh K, Heise W et al. High-level sensitivity of quantitative pp65 cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay for diagnosis of CMV disease in AIDS patients and follow-up. *J Clin Microbiol* 1996; 34(2):457-9.
218. van den Berg AP, Klompmaaker IJ, Haagsma EB, Scholten-Sampson A, Bijleveld CM, Schirm J et al. Antigenemia in the diagnosis and monitoring of active cytomegalovirus infection after liver transplantation. *J Infect Dis* 1991; 164(2):265-70.
219. Landry ML, Ferguson D. Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease. *J Clin Microbiol* 1993; 31(11):2851-6.
220. Garrigue I, Boucher S, Couzi L, Caumont A, Dromer C, Neau-Cransac M et al. Whole blood real-time quantitative PCR for cytomegalovirus infection follow-up in transplant recipients. *J Clin Virol* 2006; 36(1):72-5.
221. Meyer-Koenig U, Weidmann M, Kirste G, Hufert FT. Cytomegalovirus infection in organ-transplant recipients: diagnostic value of pp65 antigen test, qualitative polymerase chain reaction (PCR) and quantitative Taqman PCR. *Transplantation* 2004; 77(11):1692-8.
222. Hadaya K1, Wunderli W, Deffernez C, Martin PY, Mentha G, Binet I et al. Monitoring of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant recipients by an ultrasensitive plasma PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41(8):3757-64.

BIBLIOGRAFIA

223. Boeckh M, Huang M, Ferrenberg J, Stevens-Ayers T, Stensland L, Nichols WG et al. Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3):1142-8.
224. Pang XL, Chui L, Fenton J, LeBlanc B, Preiksaitis JK. Comparison of LightCycler-based PCR, COBAS amplicor CMV monitor, and pp65 antigenemia assays for quantitative measurement of cytomegalovirus viral load in peripheral blood specimens from patients after solid organ transplantation. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7):3167-74.
225. Rayes N, Seehofer D, Lullius SG, Stein A, May G, Kahl A et al. Monitoring of human cytomegalovirus, HHV-6 and HHV-7 infection in kidney transplant recipients by molecular methods to predict HCMV disease after transplantation: a prospective study. *Ann Transplant* 2005; 10(2):23-8.
226. Schröder R, Michelon T, Fagundes I, Bortolotto A, Lammerhirt E, Oliveira J et al. Antigenemia for cytomegalovirus in renal transplantation: choosing a cutoff for the diagnosis criteria in cytomegalovirus disease. *Transplant Proc* 2005; 37(6):2781-3.
227. Yang CW, Kim YO, Kim YS, Kim SY, Moon IS, Ahn HJ et al. Clinical course of cytomegalovirus (CMV) viremia with and without ganciclovir treatment in CMV-seropositive kidney transplant recipients. Longitudinal follow-up of CMV pp65 antigenemia assay. *Am J Nephrol* 1998;18(5):373-8.
228. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1):165-256.
229. Liesnard C, Donner C, Brancart F, Gosselin F, Delforge ML, Rodesch F. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstet Gynecol* 2000; 95(6 Pt 1):881-8.
230. Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, Lanari M, Bovicelli L, Nicolosi A et al. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(2):476-82.
231. Revello MG, Gerna G. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2004; 29(2):71-83.

BIBLIOGRAFIA

232. Enders G, Bäder U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn* 2001; 21(5):362-77.
233. Nanal R, Kyle P, Soothill PW. A classification of pregnancy losses after invasive prenatal diagnostic procedures: an approach to allow comparison of units with a different case mix. *Prenat Diagn* 2003; 23(6):488-92.
234. Grazia Revello M, Zavattoni M, Sarasini A, Baldanti F, De Julio C, De-Giuli L et al. al. Prenatal diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody response in blood of congenitally infected fetuses. *J Infect Dis* 1999; 180(4):1320-3
235. Revello MG, Zavattoni M, Baldanti F, Sarasini A, Paolucci S, Gerna G. Diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody in blood of congenitally infected newborns. *J Clin Virol* 1999;14(1):57-66.
236. Stagno S, Pass RF, Reynolds DW, Moore MA, Nahmias AJ, Alford CA. Comparative study of diagnostic procedures for congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 1980; 65(2):251-7.
237. Boppana SB, Smith RJ, Stagno S, Britt WJ. Evaluation of a microtiter plate fluorescent-antibody assay for rapid detection of human cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1992; 30(3):721-3.
238. Warren WP, Balcarek K, Smith R, Pass RF. Comparison of rapid methods of detection of cytomegalovirus in saliva with virus isolation in tissue culture. *J Clin Microbiol* 1992; 30(4):786-9.
239. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis* 1988; 158(6):1177-84.
240. de Vries JJ, van der Eijk AA, Wolthers KC, Rusman LG, Pas SD, Molenkamp R et al. Real-time PCR versus viral culture on urine as a gold standard in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2012; 53(2):167-70.
241. Sandin RL, Rodriguez ER, Rosenberg E, Porter-Jordan K, Caparas M, Nasim S et al. Comparison of sensitivity for human cytomegalovirus of the

polymerase chain reaction, traditional tube culture and shell vial assay by sequential dilutions of infected cell lines. *J Virol Methods* 1991; 32(2-3):181-91.

242. Nijman J, van Loon AM, de Vries LS, Koopman-Esseboom C, Groenendaal F, Uiterwaal CS et al. Urine viral load and correlation with disease severity in infants with congenital or postnatal cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2012; 54(2):121-4.

243. Brytting M, Xu W, Wahren B, Sundqvist VA. Cytomegalovirus DNA detection in sera from patients with active cytomegalovirus infections. *J Clin Microbiol* 1992; 30(8):1937-41.

244. Shibata M, Takano H, Hironaka T, Hirai K. Detection of human cytomegalovirus DNA in dried newborn blood filter paper. *J Virol Methods* 1994; 46(2):279-85.

245. Leruez-Ville M, Vauloup-Fellous C, Couderc S, Parat S, Castel C, Avettand-Fenoel V et al. Prospective identification of congenital cytomegalovirus infection in newborns using real-time polymerase chain reaction assays in dried blood spots. *Clin Infect Dis* 2011; 52(5):575-81.

246. Limaye AP, Santo Hayes TK, Huang ML, Magaret A, Boeckh M, Jerome KR. Quantitation of cytomegalovirus DNA load in dried blood spots correlates well with plasma viral load. *J Clin Microbiol* 2013; 51(7):2360-4.

247. Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels MG et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med* 2011; 364(22):2111-8.

248. Nozawa N, Koyano S, Yamamoto Y, Inami Y, Kurane I, Inoue N. Real-time PCR assay using specimens on filter disks as a template for detection of cytomegalovirus in urine. *J Clin Microbiol* 2007; 45(4):1305-7.

249. Forman M, Valsamakis A, Arav-Boger R. Dried urine spots for detection and quantification of cytomegalovirus in newborns. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73(4):326-9.

250. Koyano S, Inoue N, Oka A, Moriuchi H, Asano K, Ito Y et al. Screening for congenital cytomegalovirus infection using newborn urine samples collected on filter paper: feasibility and outcomes from a multicentre study. *BMJ Open* 2011; 1(1):e000118.

BIBLIOGRAFIA

251. Fanos V, Locci E, Noto A, Lazzarotto T, Manzoni P, Atzori L et al. Urinary metabolomics in newborns infected by human cytomegalovirus: a preliminary investigation. *Early Hum Dev* 2013; 89 (Suppl 1):S58-61.
252. Pérez JL. Monitoring techniques in cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29 (Suppl 6):18-23.
253. Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clin Infect Dis* 2012; 54(12):1793-7.
254. Caliendo AM. The long road toward standardization of viral load testing for cytomegalovirus. *Clin Infect Dis* 2013; 56(3):374-5.
255. Hirsch HH, Lautenschlager I, Pinsky BA, Cardenoso L, Aslam S, Cobb B et al. An international multicenter performance analysis of cytomegalovirus load tests. *Clin Infect Dis* 2013; 56(3):367-73.
256. Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Miller GG, Caliendo AM, Preiksaitis JK et al. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant* 2009; 9(2):258-68.
257. Lisboa LF, Asberg A, Kumar D, Pang X, Hartmann A, Preiksaitis JK et al. The clinical utility of whole blood versus plasma cytomegalovirus viral load assays for monitoring therapeutic response. *Transplantation* 2011; 91(2):231-6.
258. Jacquemard F, Yamamoto M, Costa JM, Romand S, Jaqz-Aigrain E, Dejean A et al. Maternal administration of valaciclovir in symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection. *BJOG* 2007; 114(9):1113-21.
259. Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM; Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 2005; 353(13):1350-62.
260. Nigro G, Adler SP, Parruti G, Anceschi MM, Coclite E, Pezone I et al. Immunoglobulin therapy of fetal cytomegalovirus infection occurring in the first half of pregnancy--a case-control study of the outcome in children. *J Infect Dis* 2012; 205(2):215-27.
261. Visentin S, Manara R, Milanese L, Da Roit A, Forner G, Salviato E et al. Early primary cytomegalovirus infection in pregnancy: maternal hyperimmunoglobulin therapy improves outcomes among infants at 1 year of age. *Clin Infect Dis* 2012; 55(4):497-503.

BIBLIOGRAFIA

262. Revello MG, Lazzarotto T, Guerra B, Spinillo A, Ferrazzi E, Kustermann A et al. A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. *N Engl J Med* 2014; 370(14):1316-26.
263. McCarthy FP, Giles ML, Rowlands S, Purcell KJ, Jones CA. Antenatal interventions for preventing the transmission of cytomegalovirus (CMV) from the mother to fetus during pregnancy and adverse outcomes in the congenitally infected infant. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; (3):CD008371.
264. Kimberlin DW, Lin CY, Sánchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M et al. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J Pediatr* 2003; 143(1):16-25.
265. Kimberlin DW, Acosta EP, Sánchez PJ, Sood S, Agrawal V, Homans J et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment of oral valganciclovir in the treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *J Infect Dis*. 2008; 197(6):836-45.
266. Kimberlin DW, Jester PM, Sánchez PJ, Ahmed A, Arav-Boger R, Michaels MG et al. Valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *N Engl J Med* 2015; 372(10):933-43.
267. Kampmann SE, Schindele B, Apelt L, Bühner C, Garten L, Weizsaecker K et al. Pyrosequencing allows the detection of emergent ganciclovir resistance mutations after HCMV infection. *Med Microbiol Immunol* 2011; 200(2):109-13.
268. Campanini G, Zavattoni M, Cristina E, Gazzolo D, Stronati M, Baldanti F. Multiple ganciclovir-resistant strains in a newborn with symptomatic congenital human cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2012; 54(1):86-8.
269. Komatsu TE, Pikis A, Naeger LK, Harrington PR. Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: a comprehensive review of putative resistance pathways. *Antiviral Res* 2014; 101:12-25.
270. Centers for disease control and prevention. Preventing congenital CMV infection 2012.<http://www.cdc.gov/cmvp/prevention.html>.
271. Pass RF, Zhang C, Evans A, Simpson T, Andrews W, Huang ML et al. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 2009; 360(12):1191-9.
272. McVoy MA. Cytomegalovirus vaccines. *Clin Infect Dis* 2013; 57 (Suppl 4):S196-9.

273. Rieder F, Steininger C. Cytomegalovirus vaccine: phase II clinical trial results. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20 (Suppl 5):95-102.
274. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-time quantitative PCR assays for the detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J. Clin. Microbiol* 2004; 42(11):5189-98.
275. de Vries JJ, Wessels E, Korver AM, van der Eijk AA, Rusman LG, Kroes AC et al. Rapid genotyping of cytomegalovirus in dried blood spots by multiplex real-time PCR assays targeting the envelope glycoprotein gB and gH genes. *J Clin Microbiol* 2012; 50(2):232-7.
276. Zawilińska B, Szostek S, Kopeć J, Koprynia M, Kosz-Vnenchak M. UL55 genotype diversity of cytomegalovirus strains isolated from newborns and infants hospitalized in southern Poland. *Przegl Epidemiol* 2011; 65(3):409-13.
277. Zhang MG, Wang HB, Wang YZ, Pan Q. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in congenitally infected neonates. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2011; 25(4):262-4.
278. Sahiner F, Cekmez F, Cetinkaya M, Kaya G, Kalayci T, Gunes O, et al. Congenital cytomegalovirus infections and glycoprotein B genotypes in live-born infants: a prevalence study in Turkey. *Infect Dis (Lond)* 2015; 47(7):465-71.
279. Mewara A, Mishra B, Ratho RK, Kumar P. Cytomegalovirus glycoprotein B gene polymorphism and its association with clinical presentations in infants. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; 40(4):759-64.
280. Ahumada-Ruiz S, Taylor-Castillo L, Visoná K, Luftig RB, Herrero-Urbe L. Determination of human cytomegalovirus genetic diversity in different patient populations in Costa Rica. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2004; 46(2):87-92.
281. Picone O, Costa JM, Leruez-Ville M, Ernault P, Olivi M, Ville Y. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotype and CMV DNA load in the amniotic fluid of infected fetuses. *Prenat Diagn* 2004; 24(12):1001-6.
282. Lukácsi A, Taródi B, Endreffy E, Bábinszki A, Pál A, Pusztai R. Human cytomegalovirus gB genotype 1 is dominant in congenital infections in South Hungary. *J Med Virol* 2001; 65(3):537-42.
283. Ross SA, Novak Z, Pati S, Patro RK, Blumenthal J, Danthuluri VR, et al. Mixed infection and strain diversity in congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 2011; 204(7):1003-7.

BIBLIOGRAFIA

284. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, de Deus Wagatsuma VM, Marin LJ, Duarte G, Figueiredo LT. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Brazilian mothers and their congenitally infected infants. *J Med Virol* 2007; 79(8):1164-8.
285. Shen Z, Shang SQ, Zou CC, Zheng JY, Yu ZS. The detection and clinical features of human cytomegalovirus infection in infants. *Fetal Pediatr Pathol* 2010; 29(6):393-400.
286. Renzette N, Bhattacharjee B, Jensen JD, Gibson L, Kowalik TF. Extensive genome-wide variability of human cytomegalovirus in congenitally infected infants. *PLoS Pathog* 2011; 7(5):e1001344.
287. Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, et al. Genetic linkage among human cytomegalovirus glycoprotein N (gN) and gO genes, with evidence for recombination from congenitally and post-natally infected Japanese infants. *J Gen Virol* 2008; 89(Pt 9):2275-9.
288. Choi KY, Schimmenti LA, Jurek AM, Sharon B, Daly K, Khan C, et al. Detection of cytomegalovirus DNA in dried blood spots of Minnesota infants who do not pass newborn hearing screening. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28(12):1095-8.
289. Waters A, Hassan J, De Gascun C, Kissoon G, Knowles S, Molloy E, et al. Human cytomegalovirus UL144 is associated with viremia and infant development sequelae in congenital infection. *J Clin Microbiol* 2010; 48(11):3956-62.
290. Grosjean J, Hantz S, Cotin S, Baclet MC, Mengelle C, Trares L, et al. Direct genotyping of cytomegalovirus envelope glycoproteins from toddler's saliva samples. *J Clin Virol* 2009; 46S:S43-S48.
291. Tanaka K, Numazaki K, Tsutsumi H. Human cytomegalovirus genetic variability in strains isolated from Japanese children during 1983-2003. *J Med Virol* 2005; 76(3):356-60.
292. Hyatt R, Tan-ariya P, Paca-uccaralertkun S, Mungthin M, Pongpong S. Prevalence and gB genotype distribution of human cytomegalovirus among HIV sero-negative and HIV sero-positive orphans in Thailand. *J Med Assoc Thai*. 2014; 97 Suppl 2:S136-44.
293. Paca-Uccaralertkun S, Hyatt R, Leecharoen R, Tan-Ariya P, Mungthin M, Pongpong S. Human cytomegalovirus gB1 genotypes among children who live at the Phayathai Babies' home in Nonthaburi, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2013; 44(4):636-40.

BIBLIOGRAFIA

294. Dieamant DC, Bonon SH, Peres RM, Costa CR, Albuquerque DM, Miranda EC, et al. Cytomegalovirus (CMV) genotype in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *BMC Infect Dis* 2013; 13:310.
295. Zhang X, Huang YP, Gao HN, Yang MF, Zhao H, Hu JH, et al. Quantification of cytomegalovirus glycoprotein Bn DNA in hematopoietic stem cell transplant recipients by real-time PCR. *PLoS One* 2012; 7(12):e51224.
296. Wu KG, Hung MC, Chang YT, Chen CJ, Yang SP, Liu CY et al. Occurrence of human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompetent and immunosuppressed Taiwanese patients. *Intervirology* 2011; 54(4):196-201.
297. Coaquette A, Bourgeois A, Dirand C, Varin A, Chen W, Herbein G. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2004; 39(2):155-61.
298. Wu X, Wang Y, Xu Y, Wu D, Sun A, Zhu Z, et al. Cytomegalovirus glycoprotein B genotype in hematopoietic stem cell transplant patients from China. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16(5):647-52.
299. Humar A, Kumar D, Gilbert C, Boivin G. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotypes and response to antiviral therapy, in solid-organ-transplant recipients with CMV disease. *J Infect Dis* 2003; 188(4):581-4.
300. Xia CS, Zhao XT, Sun YY, Zhang Z. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Chinese hematopoietic stem cell transplant recipients. *Intervirology* 2012; 55 (5): 342-8.
301. González-Ramírez J, Uribe-Gutiérrez G, Jiménez-Hernandez E, Velázquez-Guadarrama N, Bello-González A, Vazquez-Meraz E, Arellano-Galindo J. Cytomegalovirus gB genotype distribution in Mexican children undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Intervirology* 2012; 55(4):318-20.
302. Roubalová K, Strunecký O, Zufanová S, Procázka B, Vitek A. Genotyping of viral glycoprotein (gB) in hematopoietic stem cell transplant recipients with active cytomegalovirus infection: analysis of the impact of gB genotypes on the patients' outcome. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2010; 59(2):92-9.
303. Torok-Storb B, Boeckh M, Hoy C, Leisenring W, Myerson D, Gooley T. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. *Blood* 1997; 90(5):2097-102.
304. Sarcinella L, Mazzulli T, Willey B, Humar A. Cytomegalovirus glycoprotein B genotype does not correlate with outcomes in liver transplant patients. *J Clin Virol* 2002; 24(1-2):99-105.

305. Carraro E, Granato CF. Single human cytomegalovirus gB genotype shed in multiple sites at the time of diagnosis in renal transplant recipients. *J Med Virol* 2003; 70(2):240-3.
306. Roubalová K, Zufanová S, Vítek A, Stanková M. Prevalence of glycoprotein B (gB) genotypes in the patients with high risk of symptomatic cytomegalovirus infection. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2009; 58(4):148-53.
307. Görzer I, Kerschner H, Redlberger-Fritz M, Puchhammer-Stöckl E. Human cytomegalovirus (HCMV) genotype populations in immunocompetent individuals during primary HCMV infection. *J Clin Virol* 2010; 48(2):100-3.
308. Li W, Tao R, Zhang X, Shu Q, Gao HH, Shang SQ, et al. Rapid and sensitive identification of genotypes of gH in clinic human cytomegalovirus samples. *Jpn J Infect Dis*. 2015; 68(2):135-7.
309. Guo S, Yu MM, Li G, Zhou H, Fang F, Shu SN. Studies on genotypes of human cytomegalovirus glycoprotein H form infantile clinical isolates. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2013; 51(4):260-4.
310. Mao ZQ, He R, Sun M, Qi Y, Huang YJ, Ruan Q. The relationship between polymorphisms of HCMV UL144 ORF and clinical manifestations in 73 trains with congenital and/or perinatal HCMV infection. *Arch Virol*. 2007; 152(1):115-24.
311. Arav-Boger R. Strain variation and disease severity in congenital cytomegalovirus: in search of a viral marker. *Infect Dis Clin N Am* 2015; 29(3): 401-14.
312. Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital cytomegalovirus infection: clinical outcome. *Clin Infect Dis* 2013; 57(S4):S178-81.
313. Rivera LB, Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Predictors of hearing loss in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 2002; 110(4): 762-7.
314. Paradowska E, Studinzka M, Suski P, Kasztelewicz B, Wisnieska-Ligier M, Zawilinska B, et al. Human cytomegalovirus UL155, UL144, and US28 genotype distribution in infants infected congenitally or postnatally. *J Med Virol* 2015; 87(10): 1737-48.
315. Yu ZS, Zou CC, Zhen JY, Zhao ZY. Cytomegalovirus gB genotype and clinical features in Chinese infants with congenital infections. *Intervirology* 2006; 49(5): 281-5.
316. Chern KC, Chandler DB, Martin DF, Kuppermann BD, Wolitz RA, Margolis TP. Glycoprotein B subtyping of cytomegalovirus (CMV) in the vitreous of patients with AIDS and CMV retinitis. *J Infect Dis* 1998; 178(4): 1149-53.

BIBLIOGRAFIA

317. Vogel JU, Otte J, Koch F, Gümbel H, Doerr HW, Cinatl J Jr. Role of human cytomegalovirus genotype polymorphisms in AIDS patients with cytomegalovirus retinitis. *Med Microbiol Immunol* 2013; 202(1):37-47.
318. Tarragó D, Quereda C, Tenorio A. Different cytomegalovirus glycoprotein B genotype distribution in serum and cerebrospinalfluid specimens determined by a novel multiplex nested PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7):2872-7.
319. Oka N, Suzuki T, Inoue T, Kobayashi T, Ohashi Y. Polymorphisms in cytomegalovirus genotype in immunocompetent patients with corneal endotheliitis or iridocyclitis. *J Med Virol* 2015; 87(8):1441-5.
320. Ross SA, Novak Z, Fowler KB, Arora N, Britt WJ, Boppana SB. Cytomegalovirus blood viral load and hearing loss in young children with congenital infection. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28(7): 588-92.

VIII. ANEXOS

ANEXO I. FICHA INFECCIÓN CONGÉNITA POR CITOMEGALOVIRUS

Nombre/Apellidos:

No. Historia:

Fecha nacimiento:

Sexo:

Ciudad (domicilio habitual):

Raza/Etnia:

Caso o Control:

Fecha de obtención:

N ° muestra (indicar todas las muestras):

Tipo de muestra:

Cultivo:

PCR cualitativa CMV:

Carga viral CMV (copias/ml):

1. Carga viral en sangre
2. Carga viral en líquido amniótico

Serología embarazada/recién nacido SI NO ¿Cuál?

Genotipo glicoproteína B

Genotipo glicoproteína H:

Genotipo UL144:

Infección congénita: Asintomática o Sintomática

Exploración física completa y evaluación neurológica estructurada

Retraso en crecimiento uterino

Hepatoesplenomegalia

Rash petequeial o purpúrico

Desarrollo del paciente (Afectación)

1. Neurológica (microcefalia, letargia, hipotonía, defecto en el reflejo de succión, convulsiones).

Resonancia Magnética y Ecografía cerebral SI NO Si SI, describir:

2. Anomalías en las pruebas de **diagnóstico por imagen** (hiperrecogenicidad periventricular, calcificaciones intracraneales, ventriculomegalia o hiperrecogenicidad de

los vasos lenticuloestriados, hydrops fetal, oligohidroamnios, atrofia cortical, derrame pleural o cardíaco, calcificaciones intrahepáticas, etc.).

3. Neurosensorial (coriorretinitis: fondo de ojo y sordera: potenciales evocados)

4. Motora

5. Comunicativa

Otros (Neumonía, etc)

Complicaciones:

Evolución/Tratamiento

Analítica:

Hemograma (Leucocitos, Hematíes, Hemoglobina, Trombocitopenia(< 100.000 plaquetas/mm³)

Bioquímica con aminotransferasas: aumento de los niveles de alanina aminotransferasa > 80 **Ictericia con niveles de bilirrubina directa >3mg/dl**

ANEXO II. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS

COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS NACIONALES

XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2013. Zaragoza. 29-31 de Mayo.

L. Barrado, J.R. Otero, M.D Folgueira. Genotipos de glicoproteína B (UL55) y H (UL75) de cepas de *Citomegalovirus* humano procedentes de niños con infección congénita y adquirida.



ZARAGOZA
29-31 MAYO DE 2013
Palacio de Congresos de Zaragoza

CERTIFICADO DE PARTICIPACIÓN

El Presidente del Comité Organizador del XVII Congreso SEIMC 2013, en nombre de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

CERTIFICA QUE:

L. Barrado , J. Rodríguez Otero, M.D. Folgueira

han realizado la presentación Poster de la comunicación con título:

“Genotipos de glicoproteína B (UL55) y H (UL75) de cepas de *Citomegalovirus* humano procedentes de niños con infección congénita y adquirida ”

en el XVII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, celebrado en Zaragoza del 29 al 31 de mayo de 2013.

Y para que conste se expide el presente certificado en Zaragoza, a 31 de mayo de 2013.

Dr. Francisco Javier Castillo García
Presidente del Comité Organizador

707

